



Anca Farkas
Rahela Carpa
Anca Butiuc-Keul

Biotehnologii generale

Ghid de lucrări practice



Presa Universitară Clujeană



Anca Farkas

Rahela Carpa

Anca Butiuc-Keul

Biotehnologii generale

Ghid de lucrări practice

Presa Universitară Clujeană

2022

Referenți științifici:

Conf. univ. dr. Cristina Teodora Dobrotă

CS I dr. Adela Halmagyi

ISBN 978-606-37-1596-9

**© 2022 Autoarele volumului. Toate drepturile rezervate.
Reproducerea integrală sau parțială a textului, prin orice
mijloace, fără acordul autoarelor, este interzisă și se pedep-
sește conform legii.**

**Universitatea Babeș-Bolyai
Presa Universitară Clujeană
Director: Codruța Săcelean
Str. Hasdeu nr. 51
400371 Cluj-Napoca, România
Tel./fax: (+40)-264-597.401
E-mail: editura@ubbcluj.ro
<http://www.editura.ubbcluj.ro/>**

PREFATĂ

Biotehnologiile reprezintă un domeniu complex de metode și tehnologii care au ca scop final obținerea de produși cu destinație variată, exploatându-se diferite organisme vii sau materii organice. Domeniile de aplicabilitate ale biotehnologiilor sunt extrem de variate, întâlnite zilnic în alimentație, medicină, protecția mediului, epurarea apelor, decontaminarea solului, conservarea biodiversității și multe altele. Înțelegerea și exploatarea proceselor metabolice care stau la baza biotehnologiilor necesită metode de investigare și sisteme experimentale complexe. Cunoașterea și însușirea acestora de către studenți necesită selectarea unui set de metode și tehnici care să susțină conținutul informațional pe care studenții îl dobândesc la cursuri, dar în egală măsură să permită formarea unor competențe practice de laborator. Aceste competențe practice vor fi utile studenților ulterior, în funcție de traiectoria profesională pe care o vor urma, atât în laboratoare de analize, în producție, dar și în cercetare.

Ghidul de lucrări practice de Biotehnologii Generale cuprinde un set de metode de biotehnologii microbiene și vegetale, care se pot realiza cu ușurință în laboratoarele didactice. Fiecare lucrare practică este structurată adecvat, sunt prezentate principiul lucrării, materialele și metodologia de lucru și se finalizează cu întrebări care asigură fixarea noțiunilor. De asemenea, la fiecare lucrare sunt prezentate aplicațiile teoretice și practice ale metodologiilor abordate. Ghidul conține și o listă bibliografică actuală ce cuprinde atât lucrări științifice în domeniu cât și standardele ISO aplicabile în laborator.

Ghidul de lucrări practice de Biotehnologii Generale este destinat nu doar studenților biotehnologi, biologi și biochimiști, ci și cercetătorilor care își desfășoară activitatea în domeniul biotehnologic. Acest ghid este astfel structurat să fie conform cu programa disciplinei Biotehnologii Generale, predate studenților de la Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca și corespunde cu tematica abordată și la alte facultăți de profil de la nivel național și internațional.

PROTECȚIA MUNCII ÎN LABORATOARELE DE BIOTEHNOLOGII

Executarea cu succes a lucrărilor experimentale de biotehnologii microbiene și vegetale, precum și prevenirea accidentelor necesită, în mod obligatoriu, cunoașterea specificului laboratorului, amenajările, dotările și regulile generale de protecția muncii precum și regulile de **protecție a personalului, a probelor sau produselor și a mediului înconjurător**. Aparatura și instrumentele se manipulează conform instrucțiunilor cadrului didactic și numai la indicația acestuia.

Reguli generale în laborator

- Este strict interzis accesul persoanelor străine în laborator;
- Este interzisă intrarea studenților în laborator în lipsa permisiunii cadrului didactic;
- **Nu se va intra în laborator dacă lămpile UV pentru sterilizarea aerului și a suprafețelor sunt în funcțiune!**
 - Aparatura și obiectele din dotare se manipulează conform instrucțiunilor;
 - Reactivii, mediile de cultură deshidratate și soluțiile din laborator se manipulează cu atenție pentru a se evita contactul acestora cu pielea ori cu hainele, sau inhalarea vaporilor ori a pudrelor!
 - Nu se pornește lampa UV în hota clasa 100 fără închiderea hotei cu husa de protecție!
 - Înainte de părăsirea laboratorului se verifică să nu existe aparate în funcțiune sau robinete de apă și gaz deschise sau becurile aprinse! **Atenție la camera termostată!**
- Fiecare student are obligația de a-și supraveghea spațiul de lucru, păstrând ordinea și curățenia:
 - Fiecare student își va alege locul de lucru la începutul primei lucrări practice, loc pe care și-l va păstra până la încheierea semestrului;
 - Orice alterare a diferitelor aparate, dotări sau obiecte adiacente spațiului de lucru propriu produsă exclusiv din vina studentului, va fi penalizată;
 - Orice alterare existentă a aparaturii, obiectelor din laborator sau a zonei de lucru va fi consemnată cadrului didactic la începutul lucrării practice.

Prevenirea riscului biologic

Pentru a preveni contaminarea persoanelor și răspândirea germenilor potențial infecțioși, precum și pentru a evita infectarea probelor aflate în lucru, trebuie respectate anumite reguli de ordine interioară:

- Este obligatoriu de păstrat circuitul în laborator;
- Nu este permisă fuga sau mersul rapid prin laborator;

- Intrarea în laborator și participarea la lucrările practice se va face numai după audierea și însușirea regulilor de protecție a muncii (dovedită prin semnătură pe un proces verbal);
- Intrarea în laboratorul de microbiologie și biotehnologii necesită purtarea obligatorie a echipamentului de protecție (halat cu mâneci lungi). Se recomandă ca echipamentul de protecție să fie păstrat separat de hainele utilizate în exterior;
- Toate produsele biologice vor fi considerate ca potențial infectante;
- Consumarea de alimente și băuturi, ducerea mâinilor la față în timpul lucrului, fumatul în laborator sunt strict interzise;
- Este interzisă introducerea în gură a oricărui obiect din laborator, inclusiv a pipetelor din sticlă sau plastic, chiar și sterile;
- Este interzisă împrăștierea prin laborator a obiectelor de uz personal: hainele, servietele, gențile, etc vor fi depozitate pe cuier;
- Este permisă aducerea în laborator a materialelor de scris și a lucrurilor de valoare, acestea din urmă fiind așezate în locuri special amenajate;
- **Lucrul în laboratorul de microbiologie și biotehnologii implică posibil contact cu material infecțios!** Pentru a preveni accidentele de lucru, este necesară urmarea strictă a protocoalelor de lucru și a regulilor de dezinfecție și antisepsie:
 - Însămânțările se fac la flacără, flambându-se gâtul recipientelor la deschidere și la închidere;
 - Ansa se sterilizează înainte și după folosire prin încălzire la roșu, iar portansa se flambează;
 - Pipetele, vârfurile de pipete, lamele și lamelele contaminate nu se decontaminează la flacără, ci se scufundă după folosire în recipiente cu soluție dezinfectantă existentă în laborator;
 - Pipetarea cu gura este interzisă! Se vor folosi pipete automate sau dispozitive de pipetare adecvate;
 - Cutiile Petri, eprubetele, sau alte recipiente, precum și materialele contaminate se depozitează după lucru pe masa de infecte, pentru decontaminarea ulterioară;
 - Manipularea aparatelor se va face respectând instrucțiunile de folosire specifice;
 - Atenție la manipularea substanțelor caustice și inflamabile, precum și a flăcării de gaz!
 - În cazul răspândirii accidentale a materialului infecțios, va fi anunțat cadrul didactic care conduce lucrările și care va indica măsurile de dezinfecție;
 - Orice posibil incident se semnalează de urgență cadrului didactic!
- Înainte și după terminarea lucrului mâinile se spală cu apă caldă și săpun și/sau se dezinfectează cu soluțiile dezinfectante special destinate, disponibile în laborator.

PREPARAREA ȘI STERILIZAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ȘI A USTENSILELOR DE LABORATOR

Activități:

1. Prepararea și sterilizarea mediilor de cultură și a serului pentru diluții
2. Turnarea mediilor de cultură în plăci
3. Pregătirea eprubetelor cu agar înclinat
4. Pregătirea și sterilizarea instrumentelor de laborator

Principiul lucrării

În cazul proceselor experimentale specifice biotehnologiilor microbiene, factori precum tipul mediului de cultură, concentrația substratului, pH-ul, temperatura, agitatea, concentrația oxigenului dizolvat influențează creșterea și multiplicarea microorganismelor, atât în faza de laborator cât și în stațiile pilot și respectiv în producția industrială. Mediul de cultură reprezintă suportul nutritiv sterilizat care permite dezvoltarea și studiul unui microorganism în afara nișei ecologice naturale. Ingredientele acestuia sunt de regulă dizolvate în apă distilată, iar apoi mediul este sterilizat (Drăgan-Bularda și Samuel, 2008; Atlas, 2010; Carpa și colab., 2014).

Compoziția mediilor de cultură

Mediile pentru cultivarea microorganismelor conțin substanțele necesare pentru a susține creșterea microorganismelor. Datorită diversității microorganismelor și diverselor căi metabolice ale acestora, există numeroase medii de cultură. Mici alterări în compoziția unui mediu pot avea ca rezultat caracteristici de creștere semnificativ diferite ale microorganismelor (Atlas, 2010).

De regulă, mediile de cultură pentru culturi microbiene trebuie să conțină:

- O sursă de carbon (glucide)
- O sursă de azot: organic (aminoacizi, proteine, uree) sau anorganic (NH_3 , $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$)
- O sursă de fosfor (H_3PO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4)
- Oligoelemente: K, Mg, Fe,
- Microelemente: Mn, Ni, Co, W
- Alte componente: aminoacizi, proteine, vitamine, coenzime
- Uneori și precursori (substanțe cu porțiuni structurale ale moleculei de sintetizat), pentru creșterea randamentului biosintezei
- Agar pentru mediile solide și semisolide.

Tipuri de medii de cultură

Clasificarea mediilor de cultură implică o serie de criterii:

1. După tipul culturii:
 - Pentru culturi bacteriene
 - Pentru fungi
 - Pentru explante vegetale

2. După consistență:
 - Lichide
 - Solide
 - Semisolide
3. După compoziție:
 - Naturale
 - Sintetice
4. După tipul respirator al microorganismelor utilizate:
 - Medii pentru microorganisme aerobe
 - Medii pentru microorganisme anaerobe
5. După scopul și frecvența întrebuințării:
 - Medii de uz curent
 - Medii speciale: elective, selective, de îmbogățire, de conservare, de identificare.

Mediile speciale sunt destinate izolării, cultivării și cercetării însușirilor biologice ale anumitor specii bacteriene și cuprind:

- A. Medii de izolare, ce favorizează dezvoltarea anumitor germeni care necesită condiții speciale:
 - Medii cu ser, sânge (*Pasteurella*, *Corynebacterium*)
 - Medii cu glicerină, cu cartof, cu ou (*Mycobacterium*)
- B. Medii de îmbogățire, ce conțin substanțe care stimulează dezvoltarea unor germeni patogeni:
 - Medii hiperclorurate (tip Chapman) (*Staphylococcus*)
 - Mediul Lowenstein-Jensen (*Mycobacterium*)
 - Mediul Czapek, Sabouraud (fungi)
 - Mediul Mueller Hinton (antibiograme)
- C. Medii selective, ce favorizează, prin compoziția lor chimică, dezvoltarea anumitor germeni de interes, inhibând în același timp dezvoltarea altora, prezenți în număr redus. Agenții selectivi utilizați sunt antibiotice (ampicilină, vancomicină, cefalexină, etc.), diferiți agenți antimicrobieni (cetrimid, polimixină B, trimetoprim, amfotericină B, telurit de potasiu, nistatină, triclosan, etc.) și alte substanțe precum săruri biliare sau săruri de sodiu. Astfel de medii sunt:
 - Mediul selectiv Ryan agar pentru *Aeromonas*
 - Mediul agar cu cetrimid pentru *Pseudomonas aeruginosa*
 - Mediul Slanetz-Bartley pentru enterococi intestinali
 - Mediul Istrati-Meitert pentru *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*
- D. Medii diferențiale, ce permit creșterea diferențiată a unor specii microbiene sau pun în evidență anumite particularități metabolice cu semnificație de diagnostic: fenomene proteolitice, zaharolitice, oxidoreducătoare, diferențierea speciilor lactozo-pozitive, detectarea formării de H₂S, producerea de indol etc. Diferențierea multor microorganisme se bazează pe producerea de acid din anumiți carbohidrați și alte surse de carbon sau pe decarboxilarea aminoacizilor. Unele medii includ indicatori, în special de pH, care permit detectarea vizuală a modificărilor pH-ului rezultate din reacțiile metabolice. O serie de noi medii de cultură conțin coloranți cromogeni care își schimbă culoarea atunci când apar reacții enzimatică specifice. Astfel de medii cromogene ce permit diferențierea pe baza culorii coloniilor dezvoltate sunt:

- Mediul cromogen UTI sau mediul Chromagar pentru identificarea prezumptivă a bacteriilor responsabile de infecții urinare (*Enterococcus* sp., *E. coli*, bacterii coliforme, *Proteus* sp. *Morganella* sp. și *Providencia* sp.)
- Mediul cromogen pentru detecția *E. coli* și a bacteriilor coliforme din ape
- E. Medii de transport
- F. Medii de conservare
- G. Medii pentru controlul sterilității
- 6. După faza de biosinteză la care este utilizat mediul:
 - Medii de laborator
 - Medii pentru culturi pilot
 - Medii pentru culturi industriale
- 7. După destinația finală a culturii:
 - Medii pentru cultura inocul
 - Medii pentru cultura de regim (medii de fermentație sau de biosinteză).

Pentru cultura de explante vegetale se utilizează mai multe medii de bază cum sunt Murashige-Skoog (Murashige și Skoog, 1962), White (White, 1963), Nitsch și Nitsch (Nitsch și Nitsch, 1969) Shenk și Hildebrandt (Shenk și Hildebrandt, 1972), Gamborg (Gamborg și Shyluk, 1981), care au compoziții diferite, fiind utilizate în funcție de aplicațiile urmărite. Explantele vegetale necesită, pe lângă macro și microelemente, o combinație de vitamine (piridoxină, tiamină și acid nicotinic), mioinositol și FeEDTA, deoarece nu pot absorbi Fe decât în formă chelată.

Sterilizarea mediilor și a ustensilelor de laborator

Sterilizarea reprezintă procedura de tratare în scopul inactivării microorganismelor viabile din/de pe obiecte sau produse. Există mai multe forme de sterilizare, fiecare destinată să fie aplicată pentru o anumită țintă, iar alegerea metodei de sterilizare depinde de stabilitatea termică, fizică și chimică a acelei ținte (Jildeh și colab., 2021; Yoo, 2018).

Sterilizarea se realizează prin:

- A. Căldură umedă:
 - Autoclavare: de regulă 121°C timp de 15-20 minute pentru medii de cultură, îmbrăcăminte și instrumente (care suportă autoclavarea!), sau 133°C timp de 20-30 minute pentru decontaminarea infectelor
 - Fierbere
 - Pasteurizare
 - Tindalizare
- B. Căldură uscată:
 - Flambare (anse, instrumente metalice)
 - Sterilizare în etuvă: de regulă la 160-170°C timp de 90 minute, pentru sticlăria de laborator
- C. Radiații UV (suprafețe, aer)
- D. Radiații gamma (consumabile din plastic de unică folosință)
- E. Ultrasunete
- F. Filtrare sterilă (prin filtre cu porozitate 0,2 sau 0,1 μm)
- G. Incinerare

H. Agenți dezinfectanți. Dezinfecția suprafețelor (hote cu flux de aer laminar, mese de lucru, podele, etc) se realizează cu ajutorul soluțiilor dezinfectante (etanol 70%), menținute pentru o anumită perioadă de timp, conform unor proceduri interne de curățenie și dezinfecție. De asemenea, decontaminarea instrumentelor și a suprafețelor se poate realiza cu ajutorul unor substanțe chimice precum oxid de etilenă, hipoclorit de sodiu, cloramină, fenol, apă oxigenată, amestec sulfocromic, bicromat de potasiu.

ATENȚIE!

- TOATE REȚETELE CONȚIN INGREDIENTE PENTRU PREPARAREA UNUI LITRU DE MEDIU DE CULTURĂ
- SE VA CALCULA NECESARUL DE INGREDIENTE RAPORTAT LA VOLUMUL PREPARAT

1. Prepararea și sterilizarea mediilor de cultură și a serului pentru diluții (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se calculează necesarul de ingrediente pentru fiecare mediu în parte, conform cantității ce urmează a fi preparată.
- Mediile de cultură și serul se prepară conform rețetelor indicate mai jos, prin dizolvarea ingredientelor în apă distilată.
- Se prepară 50 ml mediu agar nutritiv, 50 ml mediu Czapek-Dox agar pentru turnare în plăci și 50 ml ser, în pahare Erlenmeyer sau baloane cu fundul plat de 100 ml.
- Se prepară 100 ml mediu agar nutritiv pentru pregătirea eprubetelor cu geloză înclinată.
- Se ajustează pH-ul mediilor de cultură și al serului conform specificațiilor.
- Serul se repartizează în eprubete, câte 9 ml/eprubetă.
- Se acoperă flacoanele și eprubetele cu medii de cultură ori ser cu capac/dop de vată/folie de aluminiu.
- Se sterilizează prin autoclavare conform specificațiilor fiecărui mediu.

Mediul agar nutritiv:

- 1000 ml apă distilată
- 3 g peptonă
- 3 g extract de carne
- 5 g NaCl
- 15 g agar
- pH 7,2 ± 0,2
- autoclavare la 120°C timp de 20 minute (Atlas, 2010).

Mediul Czapek Dox agar:

- 1000 ml apă distilată
- 30 g zaharoză
- 1 g K₂HPO₄
- 3 g NaNO₃
- 0,5 g MgSO₄ x 7H₂O
- 0,5 g KCl
- 0,01 g FeSO₄

- 15 g agar
- pH $6 \pm 0,2$
- autoclavare la 115°C timp de 20 minute (Atlas, 2010).

Ser fiziologic:

- soluție NaCl 0,85%
- pH $7 \pm 0,2$
- autoclavare la 120°C timp de 20 minute.

2. Turnarea mediilor de cultură în plăci (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- După răcorirea mediului la aproximativ 55°C (se verifică prin atingerea rapidă a flaconului cu mâna) acesta se toarnă în plăci sterile, în hota cu flux de aer laminar, câte 2-3 cutii Petri/grupă de studenți pentru fiecare tip de mediu.
- Dacă mediul de cultură a fost preparat anterior și păstrat la frigider, acesta se lichefiază prin încălzire în cuptorul cu microunde. **Atenție:** se reglează puterea cuptorului la o intensitate medie/mică pentru a se evita supraîncălzirea! În timpul fierberii, dopul flaconului riscă să cadă, mediul se contaminează și poate curge în cuptor.
- După repartizarea în cutii Petri, se închide hota și se pornește lampa UV din interiorul acesteia pentru 15 minute, timp în care va avea loc și solidificarea mediilor în plăci.

3. Pregătirea eprubetelor cu agar înclinat (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se prepară 100 ml mediu agar nutritiv.
- Se ajustează pH-ul mediului.
- Se dizolvă componentele prin încălzire în cuptorul cu microunde.
- Se distribuie câte 7 ml mediu în eprubete și se pun dopuri de vată.
- Se autoclavează.
- Se scot eprubetele cu mediul sterilizat și se așează în plan înclinat pentru solidificare.

4. Pregătirea și sterilizarea instrumentelor de laborator (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se împachetează în hârtie sticlăria necesară pentru următoarele lucrări practice (cutii Petri, pipete) dar și spatule și alte instrumente, după caz.
- Sticlăria se sterilizează la etuvă, programată la 170°C timp de 90 minute.

Întrebări:

- Prin ce se disting mediile de cultură destinate bacteriilor de cele pentru micromicete?
- Cum putem evalua dacă un mediu de cultură este steril? Dar un instrument (ex. cutie Petri, eprubetă) ?
- Cum se procedează corect la evacuarea deșeurilor cu risc biologic din laborator?

PREPARAREA DILUȚIILOR ZECIMALE SUCCESIVE ȘI INOCULAREA PE MEDII DE CULTURĂ

Activități:

1. Prepararea diluțiilor zecimale succesive de sol
2. Inocularea pe medii de cultură

Principiul lucrării

Realizarea diluțiilor zecimale succesive reprezintă o tehnică utilă pentru analize calitative și cantitative ale unei probe ori unui produs cu încărcătură mare sau necunoscută de microorganisme. Ulterior, suspensiile obținute se inoculează fie pe medii de cultură solide, agarizate, fie în medii de cultură lichide (Petersen și McLaughlin, 2016). Inocularea directă a probei și a diluțiilor succesive în medii solide permite determinarea numărului de germeni per ml sau respectiv per g de probă ori produs analizat, ca rezultat al numărării unităților formatoare de colonii (UFC) și exprimării rezultatului (ISO 6887-1:2017). Metoda determinării numărului cel mai probabil de microorganisme în medii lichide oferă o estimare a încărcăturii microbiene, însă mai puțin precisă decât inocularea eșantioanelor în medii agarizate (Drăgan-Bularda și Samuel, 2008; Carpa și colab., 2014; Farkas, 2015).

1. Prepararea diluțiilor zecimale succesive de sol (activitate pe subgrupe)

Pentru a putea determina numeric coloniile pe mediul de cultură solid este nevoie de realizarea unor diluții în ser fiziologic steril pentru probele de sol (sau orice alte probe de mediu, probe biologice ori eșantioane ale unui produs de testat). Aceste diluții se aleg astfel încât coloniile rezultate să poată fi ușor citite pe plăci (Aneja, 2005). Pentru realizarea diluțiilor succesive de sol se procedează conform schemei din Figura 1.

Metoda de lucru:

- Se așează pe un stativ 3 eprubete cu ser și se notează pe fiecare codul probei și diluția (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).
- Se cântărește în condiții sterile 1 g sol și se repartizează în prima eprubetă.
- Se omogenizează prin vortexare prima suspensie (1 g sol + 9 ml ser), se lasă la sedimentat și aceasta reprezintă diluția 10^{-1} .
- Cu ajutorul unei pipete din sticlă sterile, sau cu o pipetă automată cu vârf steril se prelevează 1 ml din suspensia realizată și se omogenizează în eprubeta a doua pentru realizarea diluției 10^{-2} .
- Se repetă operațiunea pentru realizarea diluției 10^{-3} (Figura 1).

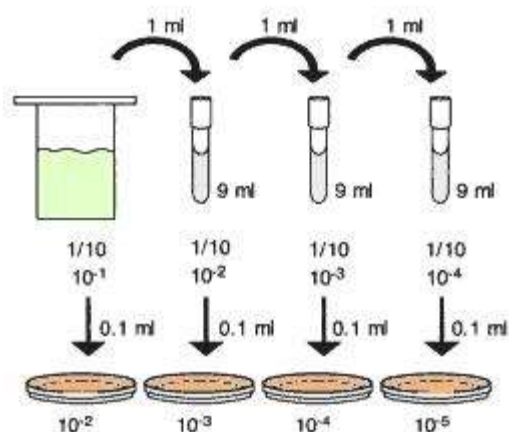


Figura 1. Schema de lucru pentru realizarea diluțiilor și inocularea probelor de sol

2. Inocularea pe medii de cultură (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se notează pe capacul plăcilor Petri codul probei, diluția inoculată și grupa.
- Utilizând o pipetă sterilă, se inoculează câte 1 ml (1000μl) suspensie de sol din eprubetele cu diluțiile 10⁻¹, 10⁻² și 10⁻³ pe câte o placă cu agar nutritiv.
- Se inoculează câte 0,1 ml (100μl) suspensie de sol din eprubetele cu diluțiile 10⁻¹, 10⁻² și/sau 10⁻³ pe câte o placă cu Czapek Dox agar.
- Se distribuie imediat inoculul pe suprafața mediului (prin răsturnare sau cu ajutorul unui spreader/spatulă steril) și se elimină excesul de lichid.
- Plăcile inoculate se răstoarnă și se introduc în camera termostată pentru incubare la 25°C timp de 7 zile.

Întrebări:

- Ce se va întâmpla dacă inoculăm un eșantion cu încărcătura microbiană foarte mare?
- Dar dacă inoculăm o suspensie în care proba este foarte diluată/concentrația microorganismelor este foarte mică?
- Dar dacă inoculăm un eșantion steril?

OBSERVAREA COLONIILOR MICROBIENE ȘI OBTINEREA CULTURILOR PURE

Activități:

1. Examinarea plăcilor Petri inoculate anterior cu diluții de sol și descrierea fenotipică a coloniilor
2. Numărarea coloniilor. Determinarea numărului de germeni per gram de sol
3. Obținerea culturilor pure

Principiul lucrării

Observațiile macroscopice asupra culturilor microbiene oferă primele indicii asupra tipului de microorganism și a diferitelor proprietăți ale acestuia (puritate, viabilitate, densitate, etc). Morfologia coloniilor este determinată genetic, însă variația fenotipică reprezintă o modalitate de adaptare a microorganismelor la condițiile de mediu.

Studiile recente indică faptul că morfotipul coloniilor bacteriene poate fi asociat cu virulența, persistența și rezistența tulpinii respective la agenți antimicrobieni (Sousa și colab., 2013). Ontologia morfologiei coloniilor reprezintă un vocabular specific, elaborat pentru caracterizarea morfotipurilor bacteriene, pentru a descrie culoarea, consistența, elevația, forma, marginea, opacitatea, mărimea, textura, teaca și suprafața coloniilor. În urma examinării, caracteristicile morfotipice ale coloniilor bacteriene cu relevanță clinică pot fi analizate și comparate cu bazele de date dedicate precum MorphoCol (<http://stardust.deb.uminho.pt/morphocol/database.php>).

1. Verificarea cutiilor Petri inoculate cu diluții de sol și descrierea fenotipică a coloniilor (activitate pe subgrupe)

Pe mediile de cultură solide pot fi observate o varietate de morfotipuri bacteriene (Figura 2A) și fungice (Figura 2B). Se examinează aspectul coloniilor izolate.

Pentru bacterii se analizează următoarele caracteristici:

- relieful: turtit, bombat, cu suprafață netedă sau rugoasă;
- conturul: bine delimitat, circular sau festonat, cu prelungiri;
- mărimea: diametru mic (de exemplu streptococii) sau colonii mari (de exemplu *Klebsiella*, etc.)
- pigmentarea coloniilor: alb și auriu la stafilococ, brun la *Azotobacter*, roșu la *Serratia* etc.
- transparența: transparente, opace sau translucide;
- consistența: untoasă-cremoasă, mucoasă, apoasă, vâscoasă, sfărâmicioasă, uscată;
- aderența la mediu;
- capacitatea de a fi emulsionate în soluție salină fiziologică;

În funcție de aceste caracteristici se deosebesc două tipuri majore de colonii bacteriene:

A) Colonii de tip neted cu suprafața bombată, netedă, lucioasă, contur bine delimitat, consistență cremoasă. Prin emulsionare cu ser fiziologic rezultă o suspensie omogenă.

B) Colonii de tip rugos, cu suprafață turtită, neregulată, contur crenelat, fastonat, uscate, aderente la mediu. În ser fiziologic dau suspensii granulare (Brambilla și colab., 2016).

Pentru fungi se analizează următoarele caracteristici:

- tipul creșterii: colonie delimitată, invazivă;
- suprafața: floculată, granulară, cretoasă, catifelată, pudrată, mătăsoasă, glabră (netedă, cremoasă), cerată;
- pigmentarea: la suprafață și pe verso;
- miceliul: vegetativ și de reproducere;
- relief: turtit, bombat, cu suprafață netedă sau rugoasă;

În principal, în soluri pot fi identificate specii de fungi aparținând genurilor *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium* și *Trichoderma* (Kichu și colab., 2020).

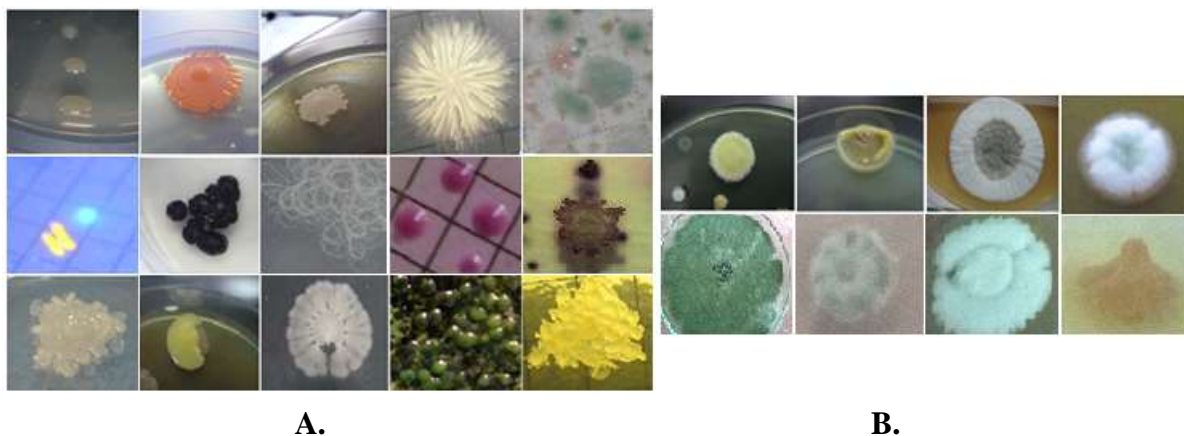


Figura 2. Morfotipuri bacteriene (A) și fungice (B) obținute pe diverse medii de cultură

2. Numărarea coloniilor. Determinarea numărului de germeni per gram de sol (activitate pe subgrupe):

O serie de metode standardizate pentru diverse aplicații detaliază tehnica de numărare a coloniilor și exprimare a rezultatului per volum sau gram de probă. Astfel de metode microbiologice constituie cerințe generale ale analizelor efectuate pentru testarea calității apei (ISO 6222/1999) sau alimentelor (ISO 7218/2007).

Metoda de lucru:

- După inspecția vizuală a plăcilor, se numără coloniile crescute pe fiecare placă Petri și se notează valoarea obținută.
- Calculul rezultatului: se exprimă ca număr de unități formatoare de colonii (UFC) per gram de probă de sol, aplicând următoarea formulă de calcul:

$$N = \frac{\sum C}{M \times 1,1 \times d}$$

Unde:

$\sum C$ = suma coloniilor numărate pe două plăci inoculate cu două diluții succesive, și cel puțin una dintre plăci conține minimum 10 colonii;

M = masa de sol inoculată în fiecare placă;

d = diluția corespunzătoare primei diluții considerate (d=1 pentru proba nediluată, d=0,1 pentru diluția 1:10, etc);

3. Selectarea și obținerea culturilor pure (activitate individuală)

Tehnica pentru inocularea în agar înclinat se derulează respectând următorii pași de lucru:

- Se selectează o colonie de pe mediul de cultură solid (agar nutritiv sau agar Czapek Dox).
- Se sterilizează ansa prin aducere la roșu și se așteaptă răcirea lângă flacăra becului de gaz.
- Se raclează cu ansa o colonie izolată.
- Ținând o eprubetă cu agar înclinat cu mâna stângă, se îndepărtează dopul cu degetul mic de la mâna dreaptă (cea în care se află și ansa) și fără a lăsa dopul jos (dopul se ține în degetul flexat pe toată durata operațiunii) se flambează gura eprubetei la flacăra becului de gaz.
- Se inoculează mediul de cultură înclinat prin introducerea în eprubetă a ansei încărcată cu tulpina de interes și prin atingerea suprafeței agarizate la retragerea ansei, în zig-zag.
- Se flambează gura eprubetei și se pune dopul.

Întrebări:

- Cum se disting între ele coloniile de fungi versus cele bacteriene?
- Care sunt mediile cu suspensii de sol inoculate pe care se observă dezvoltarea îndeosebi a fungilor? Dar a bacteriilor? De ce?
- Cuantificați încărcătura microbiană a probelor analizate ca număr de bacterii și respectiv ca număr de fungi/g de sol.
- Care sunt măsurile luate în timpul operațiunii de inoculare pentru a preveni contaminarea cu germeni din aer? Dar de pe suprafețe?
- Ce se poate întâmpla dacă nu așteptăm câteva secunde pentru răcirea ansei după flambare și prelevăm inoculul cu ansa fierbinte?

OBSERVAREA CULTURILOR MICROBIENE LA MICROSCOP

Activități:

1. Efectuarea unor frotiuri conținând tulpini pure de microorganisme
2. Observații asupra preparatelor microscopice pentru evidențierea bacteriilor, actinobacteriilor și micromicetelor

Principiul lucrării

Observațiile microscopice pot fi efectuate în preparate native (frotiuri vii) sau inactivate, observate direct sau în urma colorării microorganismelor. Colorația preparatului poate fi simplă (utilizează un singur colorant) sau dublă, cum este colorația Gram (Drăgan-Bularda și Samuel, 2008; Atlas, 2010; Carpa și colab., 2014).

1. Realizarea unor frotiuri cu tulpini pure de microorganisme (activitate individuală)

Metoda de lucru pentru efectuarea colorației simple:

- Pe o lamă microscopică degresată se pune o picătură de apă distilată.
- Se sterilizează ansa prin aducere la roșu și se răcește lângă flacăra becului de gaz.
- Se preia cu ansa sterilizată, o colonie de pe mediul de cultură agarizat și se adaugă în picătura de apă de pe lama microscopică și apoi se omogenizează.
- Se lasă la uscare frotiul la temperatura camerei și apoi se fixează la flacăra prin trecerea lamei microscopice deasupra flăcării, cu ATENȚIE!
- Lamele cu frotiul fixat se plasează pe suportul de colorare (cu frotiul în sus).
- Se acoperă frotiul cu colorant (soluție de albastru de metilen fenicat 1%, fucsină sau safranină) și se lasă să acționeze 2-3 minute.
- Se spală frotiul cu apă distilată din pisetă, scurgându-se lichidele de spălare în cuva de colorare.
- Se tamponează lamele microscopice de excesul de apă distilată și se usucă frotiul la temperatura camerei sau lângă flacăra becului de gaz.
- Se examinează la microscopul optic toate preparatele cu ajutorul obiectivului 100x utilizând ulei de imersie.

2. Observații asupra preparatelor microscopice (individual)

Metoda de lucru pentru efectuarea observațiilor microscopice:

- Se pornește și se verifică microscopul: iluminarea, deplasarea platinei, obiectivul de 100x să poată fi acționat telescopic și să nu fie murdar.
- Se așează lama microscopică pe platina microscopului, orientat cu frotiul în sus, centrat în aria razei de lumină și se fixează lama cu ajutorul cavalierilor.
- Se adaugă direct pe frotiu o picătură de ulei de imersie.
- Se rotește revolverul fixându-se la obiectivul de 100x.

- Privind la mișcarea platinei, prin acționarea vizei macrometrice se aduce în contact obiectivul de 100x cu uleiul de imersie de pe suprafața frotiului, cu acționarea vârfului telescopic al acestuia.
- ATENȚIE! Nu se forțează rotirea vizei macrometrice!
- Privind în oculare, se rotește viza macrometrică pentru o bună focalizare a preparatului.
- După focalizare se ajustează fin imaginea prin acționarea vizei micrometrice.
- Se examinează bine preparatul microscopic pentru identificarea microorganismelor prezente în preparat:
 - Bacterii: coci, bacili, diplococi, streptococi, streptobacili – microorganisme izolate sau dispuse fie grupat, fie în lanțuri (Mishra și Chauhan, 2016);
 - Actinobacterii (sub vechea denumire actinomicete) - bacterii Gram pozitive ce apar la microscop sub formă de lanțuri ramificate și intersectate (gr. aktis = rază) (Li și colab., 2016);
 - Micromicete: fungi inferiori cu o organizare specifică: hife, conidii, spori (Lagree și colab., 2018).
- La finalizarea observațiilor se oprește lampa microscopului, se degresează obiectivul cu alcool, iar lamele se colectează într-un vas pentru curățare.

Întrebări:

- Care este rolul fixării preparatului și ce alte metode de fixare a unui frotiu cunoașteți?
- Ce observați în preparatul realizat?
- Descrieți și desenați toate cele trei tipuri de microorganisme observate: bacterii, actinobacterii și micromicete.
- De ce credeți că sunt importante pentru biotehnologii? Exemplificați.

SELECȚIA DE MICROORGANISME CELULOZOLITICE

Activități:

1. Prepararea mediului de cultură pentru selecția microorganismelor producătoare de celulază
2. Inocularea mediului pentru selecția microorganismelor celulozolitice
3. Examinarea eprubetelor inoculate pentru selecția microorganismelor celulozolitice (după incubare 7 zile și periodic, până la sfârșitul semestrului)

Principiul lucrării

Într-un mediu de cultură minimal, cu unică sursă de carbon celuloza, microorganismele capabile să utilizeze celuloza (de exemplu bacterii celulozolitice de tipul *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Clostridium*, etc) vor fi nevoite să degradeze hârtia de filtru adăugată (Carpa și colab., 2014; Killham și Prosser, 2015).

1. Prepararea mediului de cultură pentru selecția microorganismelor producătoare de celulază (activitate pe subgrupe)

- Se prepară câte 100 ml mediu de cultură pentru fiecare grupă de studenți.
- Se ajustează pH-ul mediului la $7,5 \pm 0,2$.
- Se repartizează câte 9 ml/eprubetă, împreună cu câte o fâșie de hârtie de filtru tăiată la dimensiuni de aproximativ 1 x 9 cm.
- Se sterilizează prin autoclavare la temperatura de 120°C timp de 20 minute.

Mediul pentru cultivarea microorganismelor celulozolitice:

- 1 g K_2HPO_4
- 0,5 g $NaNO_3$
- 0,5 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$
- 0,5 g KCl
- 0,01 g $FeCl_3 \times 7 H_2O$
- 1000 ml apă distilată (Carpa și colab., 2014).

2. Inocularea mediului pentru selectarea microorganismelor producătoare de celulază (activitate individuală)

Descompunerea celulozei este un proces important în natură și este realizat de un număr restrâns de organisme, datorită structurii chimice a celulozei. Principalele enzime implicate în descompunerea celulozei din biomasa vegetală sunt celulazele, care sunt capabile să cliveze legăturile de tip β -1,4 din lanțul de celuloză (Lopez-Mondejar și colab., 2016). Microorganismele sunt principalii producători de enzime capabile să descompună moleculele de celuloză și hemiceluloză din sol, jucând astfel un rol deosebit în natură în descompunerea biomasei vegetale (Himmel și colab., 2010). Numeroase tulpini bacteriene izolate din sol sau din tubul digestiv al erbivorelor au fost descrise ca fiind capabile de degradarea celulozei (Gupta și colab., 2012). Multe dintre acestea aparțin încrengăturilor:

Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria și Bacteroidetes. Mai mult, studii moleculare de genomica și metagenomica au indicat că multe dintre aceste microorganisme joacă un rol deosebit și în descompunerea polizaharidelor prezente în soluri (Koeck și colab., 2014; Jimenes și colab., 2014).

Metoda de lucru:

- Se notează eprubetele cu agar înclinat (cultura pură) și cele cu mediul pentru evidențierea activității celulozolitice.
- Se sterilizează ansa prin aducere la roșu și se răcește lângă flacăra becului de gaz.
- Ținând eprubeta cu agar înclinat cu mâna stângă, se îndepărtează dopul cu degetul mic de la mâna dreaptă, cea în care se află și ansa) și fără a lăsa dopul din mână (dopul se ține în degetul flexat pe toată durata operațiunii) se flambează la flacăra gura eprubetei.
- Se prelevează inoculul din cultura pură sau dintr-o colonie izolată de pe mediul agarizat.
- Se flambează din nou gura eprubetei din care s-a efectuat prelevarea și se acoperă cu dopul.
- Ținând ansa încărcată cu tulpina de testat în mâna dreaptă, se ia eprubeta cu mediul lichid în mâna stângă, se îndepărtează dopul cu degetul mic de la mâna dreaptă, și se flambează gura eprubetei la flacăra becului de gaz.
- Se introduce ansa direct în mediul lichid și se spală inoculul în acest mediu de cultură, pe peretele eprubetei, la interfața aer-lichid (Figura 3).
- Se flambează gura eprubetei, se pune dopul și se sterilizează foarte bine ansa, prin aducere la roșu.
- Se incubează în camera termostată, la 25°C, pentru o perioadă îndelungată.

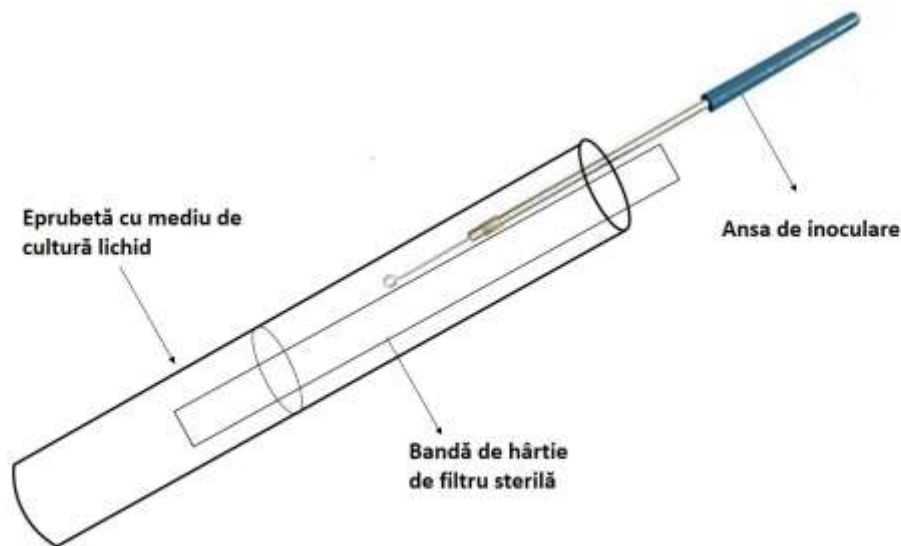


Figura 3. Reprezentarea schematică a inoculării mediului pentru selecția tulpinilor celulozolitice

3. Examinarea eprubetelor inoculate pentru selecția microorganismelor celulozolitice

Tuburile pentru evidențierea activității celulozolitice se examinează vizual după o săptămână pentru a observa dacă apar modificări în textura hârtiei. Acestea nu se decontaminează, se păstrează în camera termostată până la sfârșitul semestrului și se examinează periodic.

Întrebări:

- Glucoza este un ingredient des utilizat ca ingredient al mediilor de cultură. De ce nu se adaugă glucoză în mediul de cultură pentru microorganisme celulozolitice?
- Ați observat activitate celulozolică a vreunei tulpini testate? Cum puteți explica?

STUDIUL ANTAGONISMULUI MICROBIAN

Activități:

1. Prepararea mediului de cultură pentru evidențierea antagonismului microbial
2. Turnarea în plăci a mediului de cultură agar nutritiv (2-4 plăci Petri per grupă)
3. Inocularea în striuri încrucișate pentru evidențierea antagonismului microbial
4. Observații asupra antagonismului microbial (după incubare 7 zile)

Principiul lucrării

În urma inoculării în striuri încrucișate a două sau mai multe culturi microbiene se va evidenția dacă tulpina investigată exercită un efect inhibitor asupra dezvoltării și multiplicării altor microorganisme (Carpa și colab., 2014). Astfel pot fi identificate izolate microbiene capabile să producă noi compuși cu potențial aplicativ în terapiile antiinfecțioase împotriva unor patogeni umani (Lucero-Velasco și colab., 2018), în acvacultură (Feichtmayer și colab., 2017) sau agricultură (Uhlig și colab., 2021).

1. Prepararea mediului de cultură pentru evidențierea antagonismului microbial (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se prepară 50 ml mediu de cultură agar nutritiv pentru fiecare grupă de studenți.
- Se ajustează pH-ul mediului de cultură la $7,2 \pm 0,2$.
- Se sterilizează prin autoclavare la 121°C timp de 15 minute.

2. Repartizarea în plăci a mediului de cultură agar nutritiv (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se răcește la aproximativ 55°C mediul agar nutritiv proaspăt sterilizat sau se lichefiază mediul pregătit anterior și păstrat la frigider, prin încălzirea în cuptorul cu microunde .

Atenție: se reglează puterea cuptorului la o intensitate medie/mică pentru a se evita supraîncălzirea! În timpul fierberii, capacul flaconului riscă să cadă, mediul se contaminează și poate curge în cuptor.

- După lichefierea mediului, acesta se toarnă în plăci sterile, în hota microbiologică cu flux de aer steril, câte 2-4 cutii Petri/grupă.

- Se poate porni lampa UV pentru 10-15 minute, până la solidificarea mediului de cultură în cutiile Petri.

3. Inocularea plăcilor pentru evidențierea antagonismului microbial (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se pregătesc următoarele materiale:
 - cutiile Petri cu mediul solid nutrient agar

- tulpinile de cercetat (se selectează câteva culturi pure pe agar înclinat, diverse fenotipuri de bacterii, actinobacterii și micromicete, tot atâtea câte cutii Petri urmează a se inocula).
 - tulpini standardizate (bacterii Gram negative precum *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, sau Gram pozitive precum *Bacillus cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* ATCC 12695, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.
- Se notează pe dosul plăcii inițialele tulpinilor de testat, conform schemei din Figura 4A. Nu se trasează pe placă linii cu markerul permanent!
 - Se sterilizează ansa prin aducere la roșu și se răcește lângă becul de gaz.
 - Ținând eprubeta cu tulpina de investigat (agar înclinat) cu mâna stângă, se îndepărtăză dopul cu degetul mic de la mâna dreaptă, cea în care se află și ansa) și fără a pune dopul pe masă (dopul se ține în degetul flexat pe toată durata operațiunii) se flambează gura eprubetei la flacăra becului de gaz.
 - Se prelevează inoculul din cultura de investigat, crescută pe agar înclinat.
 - Se flambează din nou gura eprubetei și se pune dopul.
 - Se inoculează suprafața mediului agarizat prin trasarea unei linii cu ajutorul buclei ansei, pe linia diametrului plăcii (după cum denotă linia roșie din Figura 4B) .
 - Se prelevează inocul din tulpinile standard (4-6 tulpini, în funcție de dimensiunea plăcii) și se aplică striuri perpendiculare pe tulpina de investigat (marcată cu linia roșie din Figura 4B) Foarte important: striurile tulpinilor standard trebuie să atingă și să intersecteze tulpina de investigat!
 - După inocularea fiecărei tulpini standard se flambează ansa, înainte de a trece la inocularea tulpinii/plăcii următoare.
 - După inoculare, plăcile Petri se pun la incubat în camera termostată la temperatura de 25°C timp de 7 zile.

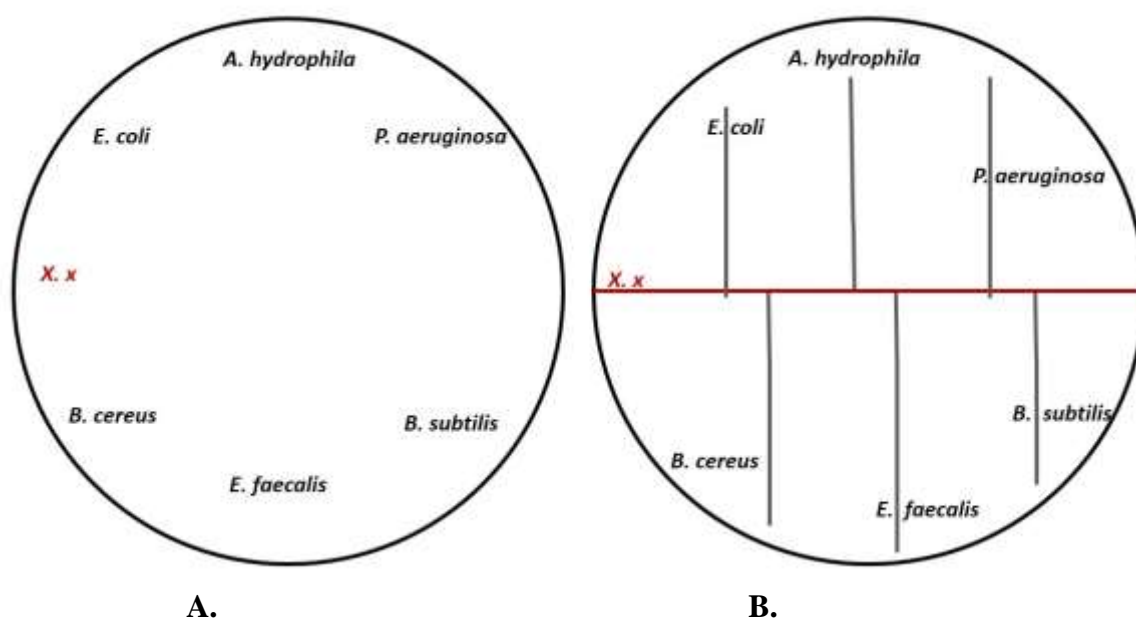


Figura 4. Marcarea plăcii Petri (A) și inocularea în striuri încrucișate (B). Se utilizează prescurtări și codificări pentru tulpina supusă investigării (X.x. codificată spre exemplu cu inițialele studentului care a izolat tulpina respectivă) și pentru tulpinile de referință (*A. hydrophila*, *E. coli*, *Ent. faecalis* *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* etc).

4. Observații asupra antagonismului microbial

- Se examinează plăcile Petri după incubare, urmărind apariția unor zone de inhibiție la intersecția striurilor.

Întrebări:

- Ce se va întâmpla dacă striurile tulpinilor standard nu ating striurile tulpinilor de investigat?
- Ce se va întâmpla dacă nu sterilizăm corect ansa după ce am atins o tulpină și trecem la inocularea următoare?

IMOBILIZAREA CELULELOR DE DROJDIE ÎN GEL DE ALGINAT

Activități:

1. Obținerea celulelor de drojdie imobilizate în gel de alginat

Principiul lucrării

Alginatul de sodiu solubil în apă, în soluția de CaCl_2 formează un gel de alginat de calciu. Granulele de alginat se vor forma prin metoda picurării printr-o seringă sterilă.

Imobilizarea este un proces mult utilizat în biotehnologii și are multiple aplicații. Astfel, se pot imobiliza celule vegetale care pot fi ulterior utilizate pentru biotransformări ale unor substraturi sau precursori, obținându-se compuși cu valoare farmaceutică sau nutritivă. De asemenea, se pot imobiliza embrioni somatici, ulterior sferele de alginat sunt deshidratate și se pot obține semințe artificiale. În acest caz, imobilizarea oferă avantajul stocării semințelor artificiale pentru o perioadă de timp mai îndelungată. De asemenea, se pot îngloba diverse săruri minerale, utilizându-se ca suport nutritiv pentru plante (granule nutritive hidratabile).

Diverse matrici de imobilizare se pot utiliza pentru înglobarea unor compuși alimentari precum lipide, uleiuri, uleiuri eterice, coloranți alimentari, siropuri, obținându-se diverse produse alimentare foarte apreciate în gastronomia moleculară (icre artificiale, spaghetti, deserturi) (Bickerstaff, 1997).

Nu în ultimul rând, anumite matrici pot servi ca suport pentru imobilizarea enzimelor, facilitând procesele enzimatice la nivel industrial, precum și îmbunătățirea calității și aspectului unor produse alimentare (aspicuri). În industria berii se urmărește imobilizarea enzimelor implicate în hidroliza zaharurilor și înlocuirea malțului (Norton și D'Amore, 1994). Imobilizarea enzimelor sau microorganismelor are aplicații și în biotehnologiile pentru protecția mediului, în scopul tratării și neutralizării deșeurilor (Bouabidi și colab., 2019).

Imobilizarea celulelor a devenit o practică importantă în biotehnologii, ducând la creșterea performanței și a rentabilității proceselor fermentative. Celulele de drojdie sunt încapsulate într-o matrice ce permite schimburile nutritive cu mediul de fermentație. Utilizarea tulpinilor selecționate de *Saccharomyces ellipsoideus* înglobate în sfere de alginat poate avea rezultate foarte bune la obținerea vinurilor spumante, ușurând considerabil procesul tehnologic clasic. Remuajul reprezintă operațiunea de rotire a sticlelor de spumant cu scopul de a aduna sedimentele în gâtul acestora. Operațiunea este de lungă durată, minuțioasă și se încheie cu degorjarea buteliilor. Degorjarea este efectul prin care sedimentele sunt eliminate, împreună cu o cantitate redusă de vin. Astfel, drojdiile imobilizate se prezintă sub forma unor sfere cu un diametru de câțiva milimetri și cu densitatea mai mare decât a vinului, putându-se manipula și îndepărta mai ușor. Remuajul se realizează în câteva secunde, poziționând sticla cu gâtul în jos, ceea ce permite colectarea acestor granule la nivelul gâtului sticlei și eliminarea lor prin degorjarea buteliei (Tița, 2003).

Obținerea celulelor de drojdie imobilizate în gel de alginat (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se pregătesc:
 - Suspensie formată dintr-un gram de drojdie uscată în 5 ml apă distilată
 - 10 ml soluție alginat de Na 5%
 - 100 ml soluție CaCl_2 75 mM
 - Suspensia de drojdie obținută se va amesteca cu soluția de alginat de sodiu și se vor adăuga câteva picături de colorant (albastru de metilen, safranină, etc).
 - Se aspiră amestecul într-o seringă sterilă.
 - În balonul cu soluția de carbonat de calciu se va plasa un magnet; balonul se va așeza pe agitatorul magnetic și apoi se pornește agitatorul la turație mică.
- Se picură amestecul din seringă în balonul cu soluția de carbonat de calciu agitată cu ajutorul magnetului (Figura 5).

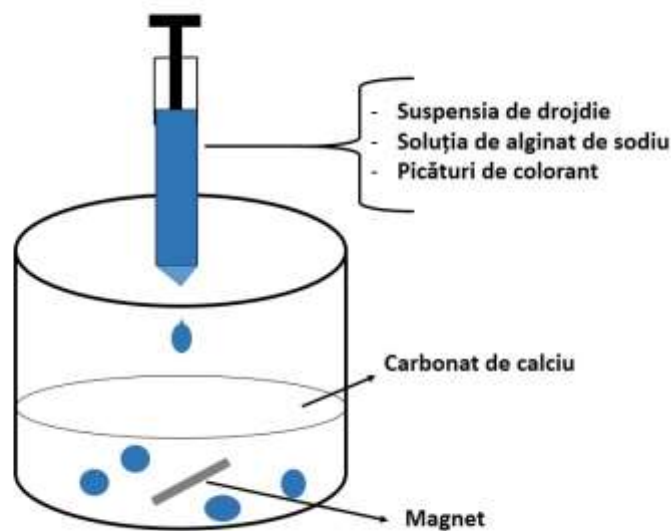


Figura 5. Reprezentarea schematică a imobilizării drojdiilor în alginat de sodiu

Atenție: Magnetul se va recupera din soluție! Granulele de drojdie imobilizate se vor păstra la frigider pentru lucrarea următoare.

Întrebări:

- Ce ați observat și cum explicați fenomenul?
- Există aplicații ale acestei proceduri?
- Ce alți compuși utili proceselor biotehnologice ar putea fi imobilizați? Care ar fi avantajele?

EVIDENȚIEREA FERMENTAȚIEI ALCOOLICE

Activități:

1. Montarea și amorsarea instalației pentru fermentația alcoolică
2. Observații asupra fermentației alcoolice

Principiul lucrării

Dioxidul de carbon rezultat în urma fermentației alcoolice a substratului glucidic se pune în evidență prin barbotare în soluție de hidroxid de bariu suplimentată cu un indicator de pH.

Fermentația alcoolică este procesul biotehnologic prin care drojdiile și unele bacterii sunt capabile să convertească diferite substraturi glucidice, rezultând alcool etilic și dioxid de carbon. În general se realizează cu tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* selecționate și standardizate. În fermentația alcoolică drojdiile descompun zaharurile la molecule de piruvat (calea glicolizei), care sunt mai apoi reduse la două molecule de alcool etilic și două molecule de CO₂ (Malakar și colab., 2020):



Fermentația alcoolică este un proces anaerob cu foarte multe aplicații biotehnologice, și anume prepararea unor băuturi alcoolice (vin, bere, spirt) sau a celor alcoolice distilate (brandy, vodcă, whisky, coniac), prepararea unor produse lactate, ca proces secundar (chefir, taette, cumis, kurunga) (Scott și Sullivan, 2008). Este de asemenea implicată în prepararea pâinii (Martínez-Anaya, 2003), dar și în obținerea unor biocombustibili cum este bioetanolul (Demirbas, 2007).

Metoda de lucru (activitate pe subgrupe):

- Se pregătesc materialele:
 - Două flacoane Erlenmeyer cu câte 50 ml soluție zaharoză 10%, care se suplimentează cu 1 g drojdie uscată (subgrupa 1) sau drojdia imobilizată în granule de alginat (subgrupa 2)
 - 100 ml soluție hidroxid de bariu 1%
- Se pregătesc instalațiile de biosinteză:
 - Flacoanele cu soluția glucidică și drojdie, prevăzute cu dop găurit, se plasează în baie de apă la temperatura maximă de 40°C
 - Se montează câte un tub de sticlă care captează gazele eliminate în fermentație și le conduce în soluția de hidroxid de bariu suplimentată cu o picătură soluție de fenolftaleină (Figura 6).
- Se notează observațiile.

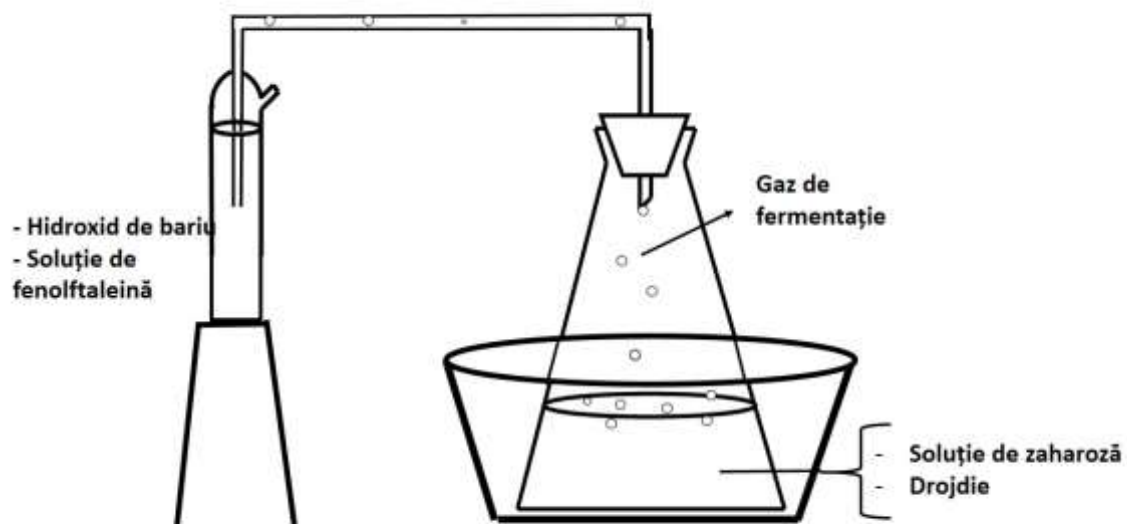


Figura 6. Reprezentarea schematică a instalației de fermentare

Întrebări:

- Ce observați? Cum puteți explica cele două fenomene?
- Reprezentați ecuația chimică ce are loc.
- La ce interval de timp se declanșează producerea dioxidului de carbon prin cele două metode?
- Ce produși de biosinteză rezultă în urma fermentației alcoolice?

DETERMINAREA NUMĂRULUI PROBABIL DE GERMEI COLIFORMI ȘI A ACTIVITĂȚII METABOLICE A MICROORGANISMELOR DIN LAPTE

Activități:

1. Prepararea mediului de cultură pentru determinarea germenilor coliformi
2. Inocularea mediilor de cultură pentru determinarea germenilor coliformi din lapte și a activității metabolice a microorganismelor din lapte
3. Înregistrarea observațiilor la analiza germenilor coliformi (după incubare 48h, respectiv 7 zile în cazul lucrărilor practice)
4. Înregistrarea observațiilor la proba reductazei
5. Testarea eficienței pasteurizării

Principiul lucrării

Gradul de contaminare a laptelui se apreciază prin determinarea numărului de germeni care se poate efectua folosind metoda directă (a diluțiilor succesive) sau indirectă (prin măsurarea activității lor metabolice). Una dintre metodele de apreciere a activității metabolice este metoda reductazei, utilizând unul din coloranții albastru de metilen sau resazurină. Principiul metodei constă în stabilirea activității reductazei (enzimă de origine microbiană), de a reduce unele soluții colorate până la leucoderivați. Astfel, albastrul de metilen adăugat în cantitate mică în proba de lapte este decolorat după un anumit timp, ca urmare a acțiunii reductoare a microorganismelor.

Numărul de bacterii coliforme reprezintă un indicator microbiologic sanitar cu semnificație deosebită, util pentru aprecierea condițiilor de producere și manipulare ale produselor și eficiența tratamentelor termice aplicate acestora. Metoda se bazează pe proprietatea bacteriilor coliforme de a fermenta lactoza dintr-un mediu lactozat, producând degajarea de gaze și acidifierea mediului, datorită formării acidului lactic.

Laptele provenit de la animalele sănătoase și manipulat în condiții corespunzătoare de igienă, conține un număr mic de microorganisme, de până la 300-500/ml. Laptele provenit de la animale cu diferite infecții mamare, sau exploatate în condiții neigienice, conține, de regulă, chiar din momentul mulgerii, un număr foarte mare de microorganisme, de sute de mii și chiar milioane/ml (Stănescu și Apostu, 2010). Laptele conține anumiți compuși cu activitate bactericidă și bacteriostatică cum sunt lactoperoxidaza (Silva și colab., 2020) și lactoferina (Superti, 2020), astfel numărul de microorganisme din lapte poate fi menținut la o valoare constantă sau chiar să scadă la câteva ore de la mulgere. Acești compuși rămân activi o perioadă mai lungă de timp dacă laptele este răcit imediat după mulgere și menținut la temperaturi joase (sub 10°C), până la tratarea lui termică. Tratatrea termică a laptelui inactivează acești compuși, ceea ce duce la pierderea capacității bactericide și bacteriostatice. Astfel, laptele pasteurizat sau procesat la temperaturi ultra-înalte (UHT) constituie mediu mai bun pentru multiplicarea germenilor decât laptele crud (Stănescu și Apostu, 2010).

În condiții normale, laptele nu ar trebui să conțină germeni patogeni dar aceștia se pot regăsi în lapte, provenind de la animalul producător de lapte, de la manipulatorul uman sau din mediu. Cei mai frecvenți patogeni sunt diverse specii de streptococi, stafilococi, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Mycobacterium*, *Brucella*, *Listeria monocytogenes* etc (Boor și colab., 2017).

Germenii coliformi reprezintă o categorie de bacilli Gram negativi aerobi și facultativ anaerobi aparținând familiei *Enterobacteriaceae*, nesporulați, care fermentează lactoza la 32-37°C cu producere de acid lactic și dioxid de carbon și au capacitatea de a se dezvolta în prezența sărurilor biliare și a altor agenți cu acțiune de suprafață. Cu toate că nu sunt exclusiv de origine fecală, fiind prezenți în cantități mari în materiile fecale ale omului și animalelor homeoterme este posibilă decelarea lor chiar și după o diluare considerabilă. Din aceste considerente, prezența lor în alimente sau în mediul înconjurător poate fi considerată ca indicator al unei poluări recente cu fecale (Farkas, 2015). Din grupul germenilor coliformi totali fac parte bacterii din genurile *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* și *Enterobacter*, care nu sunt patogeni propriu-ziși, dar în anumite condiții pot provoca boli diareice sau infecții ale tractului urinar, fiind considerați patogeni oportuniști. Fiind asociați cu enterobacteriile patogene propriu-zise, *Salmonella* și *Shigella*, germenii coliformi au o importanță deosebită pentru aprecierea calității sanitare a alimentelor și sunt considerați indicatori importanți. Astfel un număr mare de germeni coliformi într-o probă indică posibilitatea prezenței microorganismelor patogene. Coliformii fecali sunt bacterii termotolerante ce fermentează lactoza la 44°C, cum sunt *E. coli* și *Klebsiella pneumoniae* (Figura 7). Normele în vigoare impun absența bacteriilor din genul *Salmonella* pentru toate produsele pe bază de lapte, la fel ca și în cazul produselor din carne, ouă, moluște vii, fructe și legume tăiate și sucuri nepasteurizate. Produsele lactate pasteurizate sunt considerate neconforme dacă se detectează un conținut de peste 10 enterobacterii /ml la sfârșitul procesului de fabricație (CE 2073/2005).

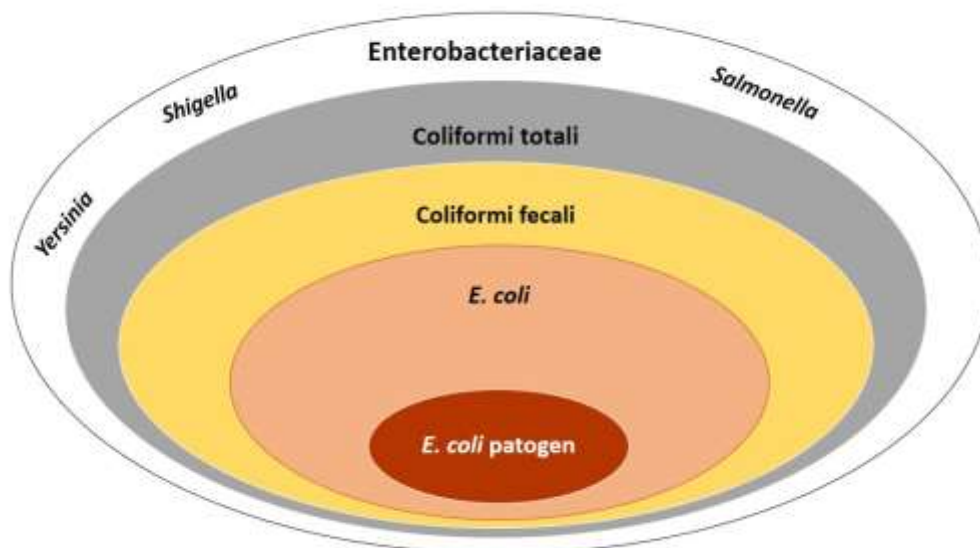


Figura 7. Grupuri și specii reprezentative de bacterii coliforme

Aprecierea calității microbiologice a laptelui se bazează de asemenea pe analize de laborator pentru detecția germenilor coliformi și a *E. coli* care, în conjuncție cu enterococii intestinali, reprezintă indicatori de contaminare fecală. Toate aceste trei categorii de bacterii trebuie să fie absente

din laptele de consum la fel cum trebuie să lipsească și din apa potabilă (Farkas, 2015). Metoda determinării numărului cel mai probabil de bacterii coliforme este standardizată în analiza apei (ISO 9308-2:2012) și a alimentelor (ISO 4831:2006). Se inoculează câte 5 eprubete din cel puțin trei diluții zecimale succesive ale produsului analizat în medii de cultură lichide, se numără tuburile cu reacție pozitivă ce denotă creșterea microbiană, corespunzătoare fiecărei diluții, iar estimarea numărului cel mai probabil de celule/ml se realizează conform tabelului statistic (Alexander, 1982) din Anexa 1.

1. Determinarea activității metabolice a laptelui (activitate pe subgrupe)

Albastrul de metilen adăugat într-o cantitate mică la proba de lapte este decolorat datorită acțiunii reducătoare a microorganismelor, iar viteza de decolorare dă indicații aproximative asupra numărului de microorganisme existente în lapte. Testul reductazei cu albastru de metilen depinde astfel de capacitatea bacteriilor din lapte de a se multiplica și de a consuma oxigenul dizolvat, care va duce implicit la scăderea potențialului de oxido-reducere al mediului. Analiza poate fi considerată terminată când întreaga probă s-a decolorat (Atherton și Newlander, 1997). În funcție de timpul de decolorare, laptele se împarte în 4 clase, conform Tabelului 1 (Apostu și Rotar, 2012; Carpa și colab., 2014).

Tabel 1. Numărul aproximativ de germeni pe baza probei cu albastru de metilen (Carpa și colab., 2014)

Timpul de decolorare	Calitatea laptelui	Clasa	Numărul de germeni/ml lapte
> 5 ^{1/2} ore	Bună	I	< 500.000
5 ^{1/2} - 2 ore	Satisfăcătoare	II	500.000 - 4×10 ⁶
2 ore - 20 minute	Proastă	III	4×10 ⁶ -20×10 ⁶
< 20 minute	Foarte proastă	IV	> 20×10 ⁶

Metoda de lucru:

- Se repartizează câte 5 ml lapte în trei eprubete curate (lapte proaspăt, lapte pasteurizat și lapte UHT).
- Se adaugă câte 1 ml soluție albastru de metilen.
- Se incubează la 37°C.
- Se examinează la intervale de 30 de minute.

2. Determinarea numărului probabil de germeni coliformi din lapte (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se pregătesc:
 - 100 ml mediu de cultură bulion lactozat (bulion MacConkey sau bulion lactoză TTC), după indicațiile producătorului.
 - Se verifică și se ajustează pH-ul mediului, conform indicațiilor producătorului.
 - Se distribuie câte 9 ml mediu de cultură în eprubete.
 - Se introduce în fiecare eprubetă câte un tubușor Durham, cu gura în jos.
 - Se acoperă eprubetele cu dopuri de vată.
 - Se autoclavează conform indicațiilor producătorului.
- Se inoculează câte 1 ml lapte (proaspăt, pasteurizat sau UHT) în mediul steril.
- Se incubează la 37°C.

- Se examinează după 48h (o săptămână în cazul lucrărilor practice).
- Numărul de bacterii coliforme/ml de lapte se calculează pe baza a trei serii de câte cinci eprubete inoculate cu trei diluții succesive ale probei. După incubare, se numără eprubetele în care a avut loc fermentația în fiecare din cele trei serii. Dacă s-au dezvoltat bacterii coliforme, acestea au fermentat lactoza din mediul de cultură și se observă virarea culorii mediului de cultură din violet în galben-verzui, datorită modificării pH-ului ca urmare a formării acidului lactic în urma fermentației. De asemenea, se observă dioxidul de carbon produs în urma fermentației și acumulat în tubușoarele Durham. Numărul cel mai probabil de bacterii coliforme/ml se determină înmulțind valoarea indicată în tabelul lui Alexander cu inversul diluției medii. Spre exemplu, dacă au fost inoculate trei serii cu diluțiile 1, 10^{-1} și 10^{-2} , iar numărul tuburilor fermentate a fost de 3-1-0, valoarea corespunzătoare din tabelul lui Alexander este 0,11. Înmulțind această cifră cu 10^1 , numărul cel mai probabil de bacterii coliforme/ml de probă este 1,1.

3. Determinarea eficienței pasteurizării laptelui - testul fosfatazei (activitate pe subgrupe)

Fosfataza alcalină se găsește în lapte în stare liberă, însă în cea mai mare parte este asociată cu membrana globulelor de grăsime. Această enzimă este folosită ca enzimă de diagnosticare a eficienței pasteurizării și pentru controlul gradului de agitare a laptelui, întrucât eliberarea enzimei din membrana globulelor de grăsime are loc prin agitarea laptelui (Țibulcă și Jimborean, 2008). Enzimele din lapte sunt termosensibile, iar laptele crud, folosit ca materie primă, se distinge de cel pasteurizat prin faptul că cel proaspăt este bogat în fosfatază alcalină, iar cel supus tratamentului termic nu mai prezintă această enzimă. După tratarea laptelui la temperaturi mari în interval scurt de timp, fosfataza alcalină are valoare negativă, însă laptele poate prezenta activitate enzimatică după depozitare (Albillos și colab., 2011). Determinarea eficienței pasteurizării și detectarea contaminării laptelui pasteurizat cu lapte nepasteurizat se determină cu ajutorul kitului SENSObiz Alkaline Phosphatase Test Kit produs de Technology Inc.

Principiul metodei

Acest kit reprezintă o tehnică ușoară și rapidă de detectare a fosfatazei alcaline din lapte. Sensorul arată un rezultat calitativ prin schimbarea culorii în zona de test a benzii. Fosfataza alcalină este enzima care este prezentă în mod natural în laptele crud, iar rezistența termică a acestei enzime este mai mare decât a microorganismelor patogene nonsporogene. Tratamentul termic aplicat la nivel industrial pentru inactivarea fosfatazei alcaline distruge totalitatea microorganismelor patogene nonsporogene. Astfel, testul fosfatazei este utilizat ca un indicator al eficienței pasteurizării.

Kitul SENSObiz Alkaline Phosphatase Test Kit poate fi utilizat în paralel cu metodele convenționale de inoculare. Pentru testare se introduce o bandă în 10 ml de probă din laptele pasteurizat iar după 5-10 minute se analizează culoarea benzii de testare. Dacă zona marcată se colorează în albastru înseamnă că nu există fosfatază alcalină, deci pasteurizarea a fost eficientă. Dacă zona se colorează în galben-verzui atunci enzima este prezentă și trebuie reluată etapa de pasteurizare (Figura 8) (https://www.busepo.com/SENSObiz%C2%AE-Biosensor-System-Test-Kit-Alkaline-Phosphatase-Test_SP8F3E_f242883451fd4c68af3035b4e5b083e3 lang=az).

Laptele nepasteurizat și produsele lactate precum iaurtul și brânzeturile din lapte neprocesat termic sunt alimente care pot să pună în pericol sănătatea consumatorului. Laptele și produsele lactate

necesită o procesare termică minimă prin pasteurizare, care este realizată prin încălzirea de scurtă durată (72°C timp de 15 secunde), pentru a distruge microorganismele eventual patogene (*Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*) care se pot întâlni în laptele crud. Intervalul de temperatură necesar pentru distrugerea *Mycobacterium tuberculosis*, cel mai rezistent patogen din laptele nepasteurizat, este puțin mai mare decât în cazul enzimei fosfatazei alcaline (Fox și Kelly, 2006). Laptele și produsele lactate care prezintă rezultate negative ale fosfatazei alcaline sunt considerate a fi pasteurizate eficient și sunt sigure pentru consum (Payne și Wilbey, 2009).

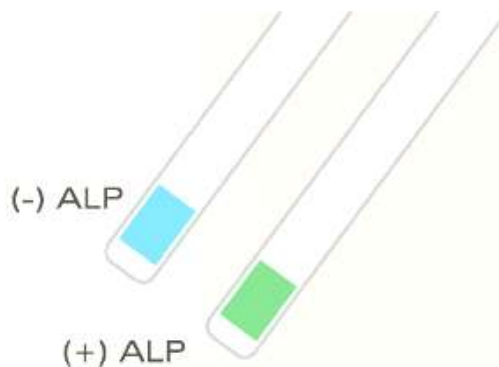


Figura 8. Determinarea eficienței pasteurizării prin detectarea fosfatazei alcaline

Întrebări:

- Ce observați la examinarea probei reductazei? La ce intervale de timp observați modificări pentru fiecare tip de lapte? Cum puteți explica?
- Care dintre analizele efectuate este calitativă, care este semicantitativă și care este cantitativă?
- Cum puteți estima numărul probabil de germeni coliformi într-o probă de analizat?
- Enumerați componentele mediului de cultură bulion lactozat și rolul lor.
- Ce tip de mediu de cultură este bulionul MacConkey? Dar mediul MacConkey agarizat? Care este scopul utilizării lor și care este scopul raportat la avantajele utilizării fiecăruia?
- Care sunt modificările care semnalează fermentația lactozei?
- Care este semnificația prezenței bacteriilor coliforme în lapte? Dar a *E. coli*?

SELECȚIA DE MICROORGANISME REZISTENTE LA SALINITATE

Activități:

1. Prepararea și repartizarea în plăci Petri a mediilor de cultură agarizate pentru realizarea gradientului de concentrație
2. Inocularea mediilor de cultură pentru selecția microorganismelor rezistente la salinitate cu diluții zecimale de sol
3. Observații privind stresselecția - creșterea microorganismelor rezistente la NaCl în gradient de salinitate (după incubare 7 zile)

Principiul lucrării

Într-un mediu agarizat cu gradient de salinitate, microorganismele halofile, rezistente, tolerante sau sensibile la NaCl vor crește în funcție de concentrația de sare disponibilă.

Condițiile nefavorabile de mediu, precum stresul osmotic, variațiile de temperatură, expunerea celulelor la toxine (etanol, antibiotice, metale grele, pesticide) și radiații (UV), carențele nutriționale, de apă sau oxigen conduc la stresul celular, care induce o serie de modificări moleculare în celule. Salinitatea crescută cauzează stres osmotic și toxicitate ionică. Organismele halofile (extremofile) și cele halotolerante pot crește la concentrații foarte variate de NaCl în funcție de factori de mediu sau nutriționali. Biotehnologia exploatează în general organismele halotolerante. Astfel s-au dezvoltat diverse aplicații ale plantelor halotolerante în agricultura zonelor aride. În ce privește microorganismele halotolerante, acestea au fost exploatate în diverse industrii fermentative (Shahbaz și colab., 2012).

Selecția organismelor (microorganisme sau plante) rezistente la diferiți factori de stres se realizează prin cultivarea acestora pe medii cu concentrații subletale a compusului ce induce stresul și selectarea organismelor rezistente. Ulterior, acestea sunt transferate pe medii cu concentrații crescânde și se selectează de fiecare dată organismele rezistente (Badea și Săndulescu, 2001; Butiuc-Keul, 2014).

Metoda de lucru (activitate pe subgrupe):

- Se pregătesc:
 - 2 x 50 ml agar nutritiv
 - 2 x 50 ml agar nutritiv suplimentat cu 10% NaCl
 - 50 ml ser fiziologic, distribuit câte 9 ml în eprubete
 - Se verifică pH-ul mediilor de cultură și se autoclavează
- Într-o cutie Petri sterilă se toarnă mediul cu sare în plan înclinat și se așteaptă 10 minute pentru solidificare (Figura 9A).
- Se îndreaptă placa Petri și se toarnă mediul fără sare, astfel se va realiza un gradient de concentrație în mediul de cultură (Figura 9B).

- Pe suprafața mediului solidificat se inoculează câte 1 ml diluție de sol și se repartizează uniform.
- Plăcile și se incubează în camera termostatăată în poziție rasturnată.
- Culturile obținute după incubare la 25°C timp de o săptămână se examinează.

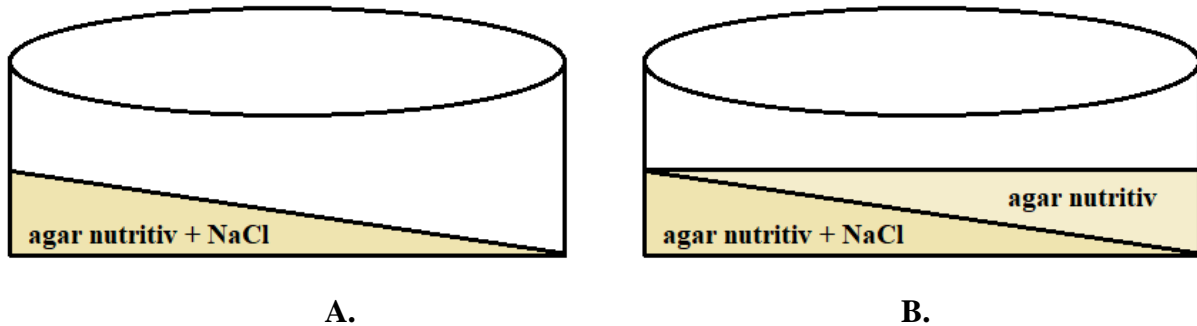


Figura 9. Turnarea mediului de cultură în gradient de concentrație

Întrebări:

- Ce observați la examinarea plăcilor inoculate în gradient de salinitate?
- Cum puteți explica creșterea microbiană?

TESTAREA CALITĂȚII AERULUI DIN INCINTE

Activități:

1. Prepararea și turnarea în plăci a mediului agar nutritiv pentru analiza aeromicrobiotei
2. Expunerea plăcilor în diferite încăperi
3. Analiza aeromicrobiotei (după incubare 24 h respectiv 7 zile în cazul lucrărilor practice)

Principiul lucrării

Analiza aeromicrobiotei se realizează prin metoda sedimentării, microorganismele din aer sunt captate pe suprafața unui mediu agarizat, urmată de numărarea unităților formatoare de colonii (UFC) (ISO 14698-1:2003).

Testele de autocontrol sunt efectuate de laboratoare, unități de producție sau sanitare, în vederea cunoașterii circulației germenilor, eventual patogeni și a evaluării eficienței procedurilor de curățenie și dezinfecție în vederea evitării contaminării probelor, produselor ori apariției infecțiilor asociate. Acestea teste cuprind:

- Teste de aeromicrobiotă - pentru controlul gradului de încărcare a aerului cu microbiota atmosferică în zonele de risc;
- Teste de sterilitate - pentru controlul sterilității instrumentarului și materialelor sanitare;
- Teste de sanitație - de verificare a eficienței curățeniei și dezinfecției suprafețelor și altor materiale utilizate în cadrul diferitelor unități.

Concentrația bacteriilor și a fungilor din aer contribuie la evaluarea riscului pentru sănătate și stă la baza standardelor pentru controlul calității aerului din exterior sau din spații interioare (Hassan și colab., 2021).

Metoda de lucru (activitate pe subgrupe):

- Se pregătește o placă Petri sterilă, conținând 15 ml agar nutritiv.
- Se plasează placa descoperită într-una din încăperile laboratorului. Capacul se așează cu deschiderea în jos, alături de cutia Petri.
- Timpul de expunere este de 10 minute și se cronometrează din momentul deschiderii plăcii Petri.
- Placa se închide la expirarea timpului de expunere și se incubează în camera termostată, timp de 48 de ore (7 zile în cazul lucrărilor practice) la 25 °C.
- Se examinează după o săptămână și se numără UFC.
- Numărul de germeni per m³ de aer din încăperea se calculează prin aplicarea formulei lui Omelianski:

$$UFC/mc\ aer = \frac{Nx10000}{S} x K$$

Unde:

N = număr de colonii de pe suprafața plăcii Petri;

S = suprafața plăcii Petri, în cm^2 ;

K = coeficientul timpului de expunere, care este $k = 1$ pentru 5 minute, $k = 2$ pentru 10 minute etc;

Interpretare: Numărul total de germeni/ m^3 aer nu trebuie să depășească 500-1500 UFC și depinde de gradul de activitate din încăpere, începutul sau sfârșitul zilei de lucru.

Întrebări:

- Care este numărul de germeni din aer în încăperile observate?
- Care este compoziția aeromicrobiotei? Care sunt riscurile unei încărcături mari cu microorganisme pentru probe, produse și pentru sănătatea persoanelor?

ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A CĂRNII

Activități:

1. Prepararea mediului de cultură, agar nutritiv și repartizarea în eprubete
2. Inocularea mediilor de cultură cu inocul de produse din carne pentru evidențierea germenilor mobili
3. Executarea de preparate microscopice native pentru menținerea viabilității microorganismelor
4. Examinarea la microscop a preparatelor microscopice și observarea motilității bacteriene

Principiul lucrării

Prezența în produsele din carne a germenilor mobili din genul *Proteus* sp., poate fi evidențiată prin inocularea eşantioanelor în condensul de la baza tuburilor cu agar înclinat. Mobilitatea acestor bacterii le permite să dezvolte colonii prin deplasarea pe suprafața mediului (TP 21:2018).

Motilitatea bacteriană este importantă pentru comportamentul chemotactic și pentru supraviețuire, având rol în colonizarea suprafețelor vii (rădăcinile plantelor în cazul bacteriilor din sol, țesuturile gazdei în cazul agenților infecțioși) sau nevii (formarea biofilmelor). Anumite bacterii, sunt capabile de motilitate, în condiții adecvate. Motilitatea constituie mișcarea autopropulsată și poate fi realizată prin unul dintre cele trei mecanisme:

- A. locomoție cu ajutorul flagelului (la genurile *Proteus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Salmonella*, *Chromatium*)
- B. mișcare elicoidală cu ajutorul unor filamente interne (la genurile *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*, *Cristispira*, *Spirochaeta*)
- C. mișcare prin alunecare cu ajutorul unui mecanism încă necunoscut, bazat pe glisarea pe secreții mucilaginoase (la genurile *Achroonema*, *Alysiella*, *Oscillatoria*)

Genul *Proteus* include bacterii Gram negative aerobe și facultativ anaerobe. *P. vulgaris* produce alterarea produselor din carne, prin degradarea aminoacizilor, producerea de biomasă bacteriană/biofilm și formarea de lipopolizaharide toxice. Răspândită în soluri și medii acvatice, *P. mirabilis* este o specie patogenă ce produce în special infecții urinare.

Metoda de lucru (activitate pe subgrupe):

- Se pregătesc:
 - 100 ml agar nutritiv, distribuit înclinat în eprubete
 - 50 ml ser fiziologic, distribuit câte 9 ml în eprubete
- Se cântăresc și se mojarază în condiții sterile câte 1 g carne/preparate din carne și se adaugă treptat câte 9 ml ser fiziologic.
- Se prelevează inocul și se inoculează la baza agarului înclinat, în picătura de condens (individual).
- Se incubează și se examinează după o săptămână.

- Se realizează câte un preparat nativ (viu) din colonie (fără încălzire la flacăra) și se efectuează observații asupra germenilor mobili (activitate individuală).

Întrebări:

- Care este semnificația testului de motilitate?
- Care sunt metodele de deplasare a bacteriilor mobile?
- Ce germeni mobili cunoașteți și care sunt nișele lor ecologice?
- Exemplificați riscurile induse de mobilitatea microorganismelor.
- Prin ce se distinge procedura realizării unui frotiu viu? Care sunt aplicațiile ei?
- Ce factori determină motilitatea falsă în cazul observațiilor microscopice? Ce reprezintă mișcarea browniană?

PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ PENTRU EXPLANTE VEGETALE ȘI INOCULAREA LOR

Activități:

1. Prepararea mediului Murashige-Skoog, pentru explante vegetale
2. Repartizarea în flacoane adecvate explantelor vegetale și sterilizarea prin autoclavare
3. Inocularea mediilor de cultură cu explante vegetale și urmărirea dezvoltării pe parcurs de 30 de zile

Principiul lucrării

Micropropagarea *in vitro* se bazează pe totipotența celulelor vegetale, capabile de a se dediferenția și rediferenția pe medii de cultură adecvate, în condiții de asepsie totală. Explantul poate regenera una sau mai multe plante clonale identice cu planta donor.

Principalele aplicații ale culturilor *in vitro* de explante vegetale sunt multiplicarea rapidă a unor variate specii, soiuri, varietăți de plante cu importanță economică sau fitogeografică, conservarea germoplasmei valoroase, unele studii de fiziologie vegetală și manipularea genetică a unor gene de interes. Culturile *in vitro* reprezintă creșterea pe medii artificiale, în condiții de asepsie deplină și de factori ambientali bine controlați a unor organe, părți de organe, țesuturi sau celule vegetale. Reușita culturii depinde de o multitudine de factori și este vizibilă în momentul în care sunt induse procesele organogenetice corespunzătoare. După intervale de timp variabile, culturile *in vitro* sunt evaluate, optimizate, conservate *in vitro* și respectiv aclimatizate la condițiile de cultură *ex vitro* (Cachiță-Cosma, 1987; Badea și Săndulescu; Trigiano și Gray, 2005; Butiuc-Keul, 2014).

Explantul reprezintă porțiunea fragmentată din planta donor (organ, țesut, celulă), constituind unitatea vie ce conține întreaga informație genetică a acesteia. Datorită totipotenței celulelor vegetale, explantul este capabil de a regenera una sau mai multe plante identice cu planta donor. Totipotența este însușirea celulelor vegetale de a se divide, de a se reproduce și de a forma o plantă identică cu planta mamă. Totipotența este deținută de fiecare celulă a plantelor, dar exprimarea sa este realizată la nivelul meristemelor, celule competente morfogenetic, capabile de a răspunde la diferiți stimuli și care, în condiții specifice, pot da naștere la tulpini, rădăcini sau embrioni (Cachiță-Cosma, 1987, Butiuc-Keul, 2014).

În biotehnologiile vegetale, mediul de cultură reprezintă suportul nutritiv sterilizat care permite dezvoltarea și studiul unui organism vegetal în afara nișei ecologice naturale.

Mediile de cultură sintetice pentru micropropagarea plantelor *in vitro* trebuie să conțină:

- A. Componenta anorganică:
 - Macroelemente: N, P, K, S, Mg, Ca.
 - Microelemente: B, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo, Al, I, Fe
- B. Componenta organică:
 - Vitamine: piridoxină, timină, acid nicotinic

- Zaharoză
- Agar sau alți agenți de gelificare
- Reglatori de creștere (fitohormoni).

1. Prepararea și sterilizarea mediilor de cultură pentru explante vegetale (activitate pe subgrupe)

Metoda de lucru:

- Se pregătesc 100 ml mediu Murashige - Skoog (Murashige și Skoog, 1962) după următoarea rețetă:

- 30 g zaharoză
- 100 ml/l soluție stoc macroelemente (Tabel 2)
- 1 ml/l soluție stoc microelemente (Tabel 3)
- 1 ml/l soluție stoc FeEDTA
- 1 ml/l soluție stoc vitamine (Tabel 4)
- 1 ml/l soluție stoc BA (benziladenină)
- 1 ml/l soluție stoc ANA (acid α -naftil acetic)
- 15 g agar
- 1000 ml apă distilată

Tabel 2. Compoziția soluției stoc de macroelemente

Compus	mg/l	mM
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61

Tabel 3. Compoziția soluției stoc de microelemente

Compus	mg/l	μ M
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91

Tabel 4. Compoziția soluției stoc de vitamine

Compus	mg/l	μ M
Mioinositol	100.00	554.94
Acid nicotinic	0.50	4.06
Piridoxină HCl	0.50	2.43
Tiamină HCl	0.10	0.30

- Se dizolvă agar-agarul prin încălzire și se repartizează mediul de cultură în flacoane speciale.

- Se acoperă cu dop permeabil (de vată) și se autoclavează 15 minute la 121°C.

2. Inocularea explantelor vegetale (activitate individuală)

Metoda de lucru:

- Se pregătesc sub hota cu flux laminar explantele vegetale de aceeași dimensiune (2 cm fragment caular din plante micropropagate) în condiții de asepsie, utilizând pense și bisturie sterile (individual).

- Se inoculează prin înfigere explantul în mediul de cultură.
- Se etanșează flaconul cu ajutorul unei folii dezinfectate.
- Se transferă flacoanele în camera de culturi vegetale și se examinează periodic.

Condițiile din camerele de vegetație sunt controlate, temperatura în jur de 23-25 °C, intensitatea luminoasă în jur de 50-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperioda de 16 ore lumină/8 ore întuneric.

Întrebări:

- Care sunt condițiile pe care trebuie să le îndeplinească un mediu de cultură pentru multiplicarea clonală a explantelor vegetale?
- Prin ce se disting mediile de cultură destinate creșterii microorganismelor de cele pentru explante vegetale?
- Care sunt avantajele și dezavantajele culturilor *in vitro*?
- Cum se vor putea aclimatiza clonele micropropagate *in vitro* la condiții *ex vitro*?

Anexa 1.**Tabel cu numerele cele mai probabile** (Alexander, 1982).

P1	P2	Numărul cel mai probabil / P3					
		0	1	2	3	4	5
0	0	-	0,018	0,036	0,054	0,072	0,090
0	1	0,018	0,036	0,055	0,073	0,091	0,11
0	2	0,037	0,055	0,074	0,092	0,11	0,13
0	3	0,056	0,074	0,093	0,11	0,13	0,15
0	4	0,075	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17
0	5	0,094	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19
1	0	0,020	0,040	0,060	0,080	0,10	0,12
1	1	0,040	0,061	0,081	0,10	0,12	0,14
1	2	0,061	0,082	0,10	0,12	0,15	0,17
1	3	0,083	0,10	0,13	0,15	0,17	0,19
1	4	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22
1	5	0,13	0,15	0,17	0,19	0,22	0,24
2	0	0,045	0,068	0,091	0,12	0,14	0,16
2	1	0,068	0,092	0,12	0,14	0,17	0,19
2	2	0,093	0,12	0,14	0,17	0,19	0,22
2	3	0,12	0,14	0,17	0,20	0,22	0,25
2	4	0,15	0,17	0,20	0,23	0,25	0,28
2	5	0,17	0,20	0,23	0,26	0,29	0,32
3	0	0,078	0,11	0,13	0,16	0,20	0,23
3	1	0,11	0,14	0,17	0,20	0,23	0,27
3	2	0,14	0,17	0,21	0,24	0,27	0,31
3	3	0,17	0,21	0,24	0,28	0,31	0,35
3	4	0,21	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40
3	5	0,25	0,29	0,32	0,37	0,41	0,45
4	0	0,13	0,17	0,21	0,25	0,30	0,36
4	1	0,17	0,22	0,26	0,31	0,36	0,42
4	2	0,22	0,26	0,32	0,38	0,44	0,50
4	3	0,27	0,33	0,39	0,45	0,52	0,59
4	4	0,34	0,40	0,47	0,54	0,62	0,69
4	5	0,41	0,48	0,56	0,64	0,72	0,81
5	0	0,23	0,31	0,43	0,58	0,76	0,95
5	1	0,33	0,46	0,64	0,80	1,10	1,30
5	2	0,49	0,70	0,95	1,20	1,50	1,80
5	3	0,79	1,10	1,40	1,80	2,10	2,50
5	4	1,30	1,70	2,20	2,80	3,50	4,30
5	5	2,40	3,50	5,40	9,20	16,0	>18

BIBLIOGRAFIE

Albillos SM, Reddy R, Salter R. 2011. Evaluation of alkaline phosphatase detection in dairy products using a modified rapid chemiluminescent method and official methods. *Journal of Food Protection* 74 (7):1144-1154. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-422.

Alexander M. 1982. Most probable number method for microbial populations. În: AL Page, RH Miller, DR Keeney, eds, *Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties*. 2nd ed. American Society of Agronomy, Madison, pp. 815-820.

Aneja KR. 2005. *Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology*. 4th ed, New Age Publishers, New Delhi.

Apostu S, Rotar AM. 2012. *Microbiologia produselor alimentare*. Vol. II, Ediția a III-a, Editura Risoprint, Cluj-Napoca.

Atherton HV, Newlander JA. 1997. *Chemistry and testing of dairy products*. 4th ed, Avi Publishing Company, Westport.

Atlas RM. 2010. *Handbook of microbiological media*. 3rd ed, CRC Press, Boca Raton.

Badea ME, Săndulescu D. 2001. *Biotehnologii vegetale*. Fundația Biotech, București.

Butiuc-Keul A. 2014. *Biotehnologie generală*. Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca.

Bickerstaff GF. 1997. Immobilization of enzymes and cells. În: JM Guisan, ed., *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press, Madrid, pp. 1-11.

Boor KJ, Wiedmann M, Murphy S, Alcaine S. 2017. A 100-year review: Microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science* 100(12):9933-9951. doi:10.3168/jds.2017-12969.

Bouabidi ZB, El-Naas MH, Zhang Z. 2019. Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: a review. *Environmental Chemistry Letters* 17(1):241-257. doi:10.1007/s10311-018-0795-7.

Brambilla C, Llorens-Fons M, Julián E, Noguera-Ortega E, Tomàs-Martínez C, Pérez-Trujillo M, Byrd TF, Alcaide F, Luquin M. 2016. *Mycobacteria* clumping increase their capacity to damage macrophages. *Frontiers in Microbiology* 7:1562. doi:10.3389/fmicb.2016.01562.

Cachiță-Cosma D. 1987. *Metode in vitro la plantele de cultură-baze teoretice și practice*. Ed. Ceres, București.

Carpa R, Drăgan-Bularda M, Muntean V. 2014. *Microbiologie generală, lucrări practice*. Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca.

CE 2073/2005 Regulamentul Comisiei Europene privind criteriile microbiologice pentru produsele alimentare. Parlamentul European, pp. 1-37.

Demirbas A. 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33(1):1-18. doi:10.1016/j.pecs.2006.06.001.

Drăgan-Bularda M, Samuel AD. 2008. *Biotehnologii microbiene*. Editura Universității din Oradea, Oradea.

Farkas A. 2015. *Apa potabilă și biofilmul*. Presa Universitară Clujeană, Cluj-Napoca.

Feichtmayer J, Deng L, Griebler C. 2017. Antagonistic microbial interactions: Contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. *Frontiers in Microbiology* 8:2192. doi:10.3389/fmicb.2017.02192.

Fox PF, Kelly AL. 2006. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects-Part 2. *International Dairy Journal* 16, 517-532. doi:10.1016/j.idairyj.2005.09.017

Gamborg OL, Shyluk JP. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. În: TA Thorpe, ed., *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press Inc., New York, pp. 21-44.

Gupta P, Samant K, Sahu A. 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology* 578925. doi:10.1155/2012/578925.

Hassan A, Zeeshan M, Bhatti MF. 2021. Indoor and outdoor microbiological air quality in naturally and mechanically ventilated university libraries. *Atmospheric Pollution Research* 12(8):101136. doi:10.1016/j.apr.2021.101136

Himmel ME, Xu Q, Luo Y, Ding S-Y, Lamed R, Bayer EA. 2010. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels* 1(2):323-341. doi:10.4155/bfs.09.25.

ISO 4831:2006 *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique*. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 6222:1999 *Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 6887-1:2017 *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 7218:2007/Amd.1:2013 *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 9308-2:2012 *Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method*. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 14698-1:2003 *Cleanrooms and associated controlled environments — Biocontamination control — Part 1: General principles and methods*. International Organization for Standardization, Geneva.

Jildeh ZB, Wagner PH, Schöning MJ. 2021. Sterilization of objects, products, and packaging surfaces and their characterization in different fields of industry: The status in 2020. *Physica Status Solidi A*, 2000732. doi:10.1002/pssa.202000732.

Jiménez, DJ., Dini-Andreote, F, van Elsas, JD. 2014. Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. *Biotechnology for Biofuels* 7:92. doi:10.1186/1754-6834-7-92.

Kichu A, Ajungla T, Yeptho L. 2020. Colonial and morphological characteristics of soil fungi from Jhum Land. *Indian Journal of Agricultural Research* 54(1):1-9. doi:10.18805/IJARE.A-5265.

Killham K, Prosser JI. 2015. The Bacteria and Archaea. În: A. Paul, ed., *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. 4th Ed. Academic Press, 41-76. doi:10.1016/B978-0-12-415955-6.00003-7.

Koeck DE, Pechtl A, Zverlov VV, Schwarz WH. 2014. Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinions in Biotechnology* 29:171–183. doi:10.1016/j.copbio.2014.07.002.

Lagree K, Desai JV, Finkel JS, Lanni F. 2018. Microscopy of fungal biofilms. *Current Opinions in Microbiology* 43:100-107. doi:10.1016/j.mib.2017.12.008.

Li Q, Chen X, Jiang Y, Jiang C. 2016. Morphological identification of Actinobacteria. În: D. Dhanasekaran, Y. Jiang, eds., *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, IntechOpen, Londra, pp. 59-86. doi:10.5772/61461.

López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D. Riedel K, Baldrian P. 2016. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports* 6, 25279. doi:10.1038/srep25279.

Lucero-Velasco EA, Molina-Garza ZJ, Galaviz-Silva L. 2018. First survey of cultivable bacteria from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and assessment of the antagonism against five microorganisms of clinical importance. *International Journal of Acarology* 44(4-5): 204-209. doi:10.1080/01647954.2018.1495262.

Malakar S. Paul SK. Jolvis Pou KR. 2020. Biotechnological interventions in beverage production. În: A Grumezescu, AM Holban, eds., *Biotechnological progress and beverage consumption, vol 19: The science of beverages*, pp. 1-37, Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-816678-9.00001-1.

Martínez-Anaya MA. 2003. Associations and interactions of microorganisms in dough fermentations: effects on dough and bread characteristics. În: K Kulp, K Lorenz, eds., *Handbook of dough fermentations*. CRC Press, Boca Raton, pp. 87-120.

Mishra M, Chauhan P. 2016. Applications of microscopy in bacteriology. *Microscopy Research* 4(1):1-9. doi:10.4236/mr.2016.41001.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nitsch JP, Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163(3862):85-87. doi:10.1126/science.163.3862.85.

Norton S, D'Amore T. 1994. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(5):365-375. doi:10.1016/0141-0229(94)90150-3.

Payne C, Wilbey RA. 2009. Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: a quantitative comparison of fluorophos and colourimetric procedures. *International Journal of Dairy Technology* 62:308-314. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00503.x.

Petersen J, McLaughlin S. 2016. *Laboratory exercises in microbiology: Discovering the unseen*. City University of New York, New York, pp. 1-184.

Schenk RU, Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-204. doi:10.1139/b72-026.

Scott R, Sullivan WC. 2008. Ecology of fermented foods. *Human Ecology Review* 15(1):25-31.

Shahbaz M, Ashraf M, Al-Qurainy F, Harris PJ. 2012. Salt tolerance in selected vegetable crops. *Critical reviews in plant sciences* 31(4):303-320. doi:10.1080/07352689.2012.656496.

Silva E, Oliveira J, Silva Y, Urbano S, Sales D, Moraes E, Rangel A, Anaya K. 2020. Lactoperoxidase system in the dairy industry: Challenges and opportunities. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(6):337-346. doi.org/10.17221/103/2020-CJFS.

Sousa AM, Machado I, Nicolau A, Pereira MO. 2013. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*. 95(3):327-335. doi:10.1016/j.mimet.2013.09.020.

Superti F. 2020. Lactoferrin from bovine milk: A protective companion for life. *Nutrients* 12(9):2562. doi:10.3390/nu12092562.

Stănescu V, Apostu S. 2010. *Igiena, inspecția și siguranța alimentelor de origine animal*. Vol 1. Risoprint, Cluj-Napoca, pp. 1-610.

Țița O. 2003. Aspecte privind utilizarea celulelor de drojdie imobilizate în industria fermentativă. *Buletinul AGIR* 3:93-95.

Trigiano RN, Gray D. 2005. *Plant Development and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton.

Țibulcă D, Jimborean MA. 2008. *Tehnologia de obținere a produselor lactate*, Risoprint, Cluj-Napoca.

Uhlig E, Kjellström A, Nurminen N, Olsson C, Oscarsson E, Canaviri-Paz P, Mogren L, Alsanius B, Molin G, Håkansson A. 2021. Use of bacterial strains antagonistic to *Escherichia coli* for biocontrol of spinach: A field trial. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 74:102862. doi:10.1016/j.ifset.2021.102862.

White PR. 1963. *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press, New York.

TP 21:2018 *Bacteriology – test procedures. Motility test*. UK Standards for Microbiology Investigations. Standards Unit, National Infection Service, PHE, Londra.

Yoo JH. 2018. Review of disinfection and sterilization - Back to the basics. *Infection and Chemotherapy* 50(2):101-109. doi:10.3947/ic.2018.50.2.101.

<http://stardust.deb.uminho.pt/morphocol/database.php>

[https://www.busepo.com/SENSObiz%C2%AE-Biosensor-System-Test-Kit-Alkaline-Phosphatase-Test_SP8F3E_f242883451fd4c68af3035b4e5b083e3 lang=az](https://www.busepo.com/SENSObiz%C2%AE-Biosensor-System-Test-Kit-Alkaline-Phosphatase-Test_SP8F3E_f242883451fd4c68af3035b4e5b083e3_lang=az)

CUPRINS

PREFAȚĂ.....	5
PROTECȚIA MUNCII ÎN LABORATOARELE DE BIOTEHNOLOGII	6
PREPARAREA ȘI STERILIZAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ȘI A USTENSILELOR DE LABORATOR	8
PREPARAREA DILUȚIILOR ZECIMALE SUCCESIVE ȘI INOCULAREA PE MEDII DE CULTURĂ.....	13
OBSERVAREA COLONIILOR MICROBIENE ȘI OBȚINEREA CULTURILOR PURE	15
OBSERVAREA CULTURILOR MICROBIENE LA MICROSCOP	18
SELECȚIA DE MICROORGANISME CELULOZOLITICE.....	20
STUDIUL ANTAGONISMULUI MICROBIAN	23
IMOBILIZAREA CELULELOR DE DROJDIE ÎN GEL DE ALGINAT	26
EVIDENȚIEREA FERMENTAȚIEI ALCOOLICE.....	28
DETERMINAREA NUMĂRULUI PROBABIL DE GERMEI COLIFORMI ȘI A ACTIVITĂȚII METABOLICE A MICROORGANISMELOR DIN LAPTE.....	30
SELECȚIA DE MICROORGANISME REZISTENTE LA SALINITATE	35
TESTAREA CALITĂȚII AERULUI DIN INCINTE.....	37
ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A CĂRNII	39
PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ PENTRU EXPLANTE VEGETALE ȘI INOCULAREA LOR.....	41
Anexa 1.	44
BIBLIOGRAFIE.....	45
CUPRINS.....	50



ISBN: 978-606-37-1596-9